

**Die Beziehung der ersten
Komplement-Komponente
zur
esterolytischen und antikomplementären
Aktivität:
Vergleichende Untersuchungen
bei verschiedenen Säugetieren**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades**

**bei der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johannes-Gutenberg-Universität
zu Mainz**

Annemarie Steinbrecher
aus Pouch

Mainz 1966



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554814_0019



**Die Beziehung der ersten
Komplement-Komponente
zur
esterolytischen und antikomplementären
Aktivität:
Vergleichende Untersuchungen
bei verschiedenen Säugetieren**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

bei der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Johannes-Gutenberg-Universität
zu Mainz

Annemarie Steinbrecher
aus Pouch

Mainz 1966

Die Bestimmung der ersten
Komponentenkomponente

zur

estorischen und antikompositionen

Aktivist

Vergleichende Untersuchungen

bei verschiedenen Zungen



der Bildung

der Bildung

der Bildung

der Bildung

Annahme der Bildung

der Bildung

der Bildung

Dekan:	Prof. Dr. L. Horner
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Mislin
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. P. Klein
Tag der mündlichen Prüfung:	21.7.1966

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	8
ERGEBNISSE	15
I. <u>Spezifische Reinigung von Meerschweinchen-C'₁ durch Dissoziation des Antigen-Antikörper-C'₁-Komplexes</u>	15
1). Verschwinden von freiem C' ₁ nach Behandlung mit SA-Komplexen.	15
2). Reinigung von C' ₁ durch Dissoziation des SAC' ₁ -Komplexes mit hypertonischer NaCl-Lösung.	16
3). Dissoziation des SAC' ₁ -Komplexes durch EDTA.	19
II. <u>Verwendbarkeit der spezifischen Reinigung für das C'₁ verschiedener Säugetiere</u>	20
III. <u>Versuche zur chemisch-physikalischen Charakterisierung der C'₁-Aktivität von Meerschweinchen-Serum</u>	22
1). Verhalten in der Gelfiltration	22
2). Ultrazentrifugierung	25
3). Säulen-Chromatographie mit Cellulose	25
4). Präparative Elektrophorese	25
IV. <u>Die antikomplementäre Wirkung von C'₁-Präparaten</u>	27

	Seite
1). Präparate aus Meerschweinchen-Serum	27
2). Präparate aus Serum von anderen Säuge- tieren	29
3). Herstellung von C' ₁ -Dissoziations-Prä- paraten des Meerschweinchens unter be- sonderen Milieubedingungen	31
V. <u>Die esterolytische Wirkung von C'₁-Präparaten</u>	36
1). Präparate aus Meerschweinchen-Serum	36
2). Präparate aus dem Serum anderer Säuge- tiere	37
3). Herstellung eines spezifisch gereinigten, 38 esterasefreien Meerschweinchen-C' ₁ -Prä- parates	
DISKUSSION	40
ZUSAMMENFASSUNG	47
LITERATURVERZEICHNIS	49

EINLEITUNG

Man bezeichnet als Immunhämolysen die Auflösung von Erythrozyten durch das Zusammenwirken von Antikörper und Komplement (siehe Mayer, 1965). Der dem Erythrozyten homologe Antikörper wird dabei in einem ersten Akt an die Oberfläche der Zelle gebunden. Der auf diese Weise mit dem Antikörper spezifisch "beladene" Erythrozyt wird als "sensibilisiert" bezeichnet und acquiriert damit die Fähigkeit, in einem zweiten Akt mit frischem Normalserum zu reagieren. Als Endresultat dieser zweiten Reaktion erfolgt eine Strukturzerstörung (Hämolysen) des Erythrozyten. Das hämolytische Agens aus normalem Serum wird Komplement (C') genannt (Pillemer u. Ecker, 1941). Nach heutiger Anschauung ist Komplement ein System von mindestens neun distinkten Proteinen, deren Aktivitäten mit den Symbolen C'₁ - C'₉ bezeichnet werden (Complement workshop 1963, 1966). Diese Proteine imponieren alle als β -Globuline (Müller-Eberhard, 1965a). Bei der Reaktion mit der sensibilisierten Zelle treten die als Komplement-Komponenten bezeichneten neun Proteine nacheinander mit dem sensibilisierten Erythrozyten in Reaktion. Die Reihenfolge dieser Serie von Einzelreaktionen steht fest; sie lautet: C'₁, C'₄, C'₂, C'₃, C'₅, C'₆, C'₇, C'₈, C'₉. Eine Änderung dieser charakteristischen Sequenz ist nicht möglich. Bei dem sequenzartigen Ablauf der Teilreaktionen entstehen sukzessive eine Reihe von charakteristischen Funktionszuständen der Zelle, die als EAC'₁, EAC'_{1,4} usw. bezeichnet werden. Diese zellulären Intermediärprodukte können durch ihre Reaktionsfähigkeit mit Komplementfragmenten charakterisiert werden (Klein, 1960; Colli u. Mitarb., 1961; Opferkuch u. Mitarb., 1961; Wellensiek u. Klein, 1965; Nelson u. Mitarb., 1965). Das Intermediärprodukt EAC'₁ benötigt zur Lyse nicht mehr das Gesamt-Komplement, sondern nur noch die acht Faktoren C'₄, C'₂, C'₃, C'₅, C'₆, C'₇, C'₈, C'₉. Das Produkt EAC'_{1,4} lysiert bereits bei Anwesenheit der sieben Komponenten C'₂, C'₃, C'₅, C'₆, C'₇, C'₈, C'₉ usw.

Nach den heutigen Vorstellungen besteht der erste Schritt der Reaktion zwischen Ag-Ak-Aggregat und dem Komplement in einer materiellen Bindung der sogenannten ersten Komponente (C'_1) an den Ag-Ak-Komplex (Müller-Eberhard u. Mitarb., 1961a). Als erste Komplementkomponente wird ein Faktor bezeichnet, der in den Euglobulinen tierischer und menschlicher Seren vorkommt und hitzelabil ist. Neuere Befunde deuten darauf hin, daß die erste Komplement-Komponente aus einem durch Ca^{++} zusammengehaltenen Komplex von drei Untereinheiten besteht, die als C'_{1q} , C'_{1r} und C'_{1s} bezeichnet werden (Naff u. Mitarb., 1964). Bei der Reaktion des gesamten C'_1 -Komplexes mit dem Ag-Ak-Komplex soll C'_{1q} als reaktive Bindungsgruppe des Gesamtmoleküls zum Ag-Ak-Komplex wirken. Andererseits funktioniert die Untereinheit C'_{1s} als Proenzym (Proesterase). Man stellt sich vor, daß durch die Bindung des C'_1 -Makromoleküls an den Ag-Ak-Komplex die Proesterase zur Esterase aktiviert wird (Lepow, 1959; Becker, 1961). Die Esterase soll dann die in der Reaktionssequenz als nächster Faktor in Erscheinung tretende Komponente C'_4 enzymatisch verändern und es entstehen dann beim enzymatisch veränderten C'_4 reaktive, aber labile Gruppen, die mit Teilstrukturen des Ag-Ak-Komplexes in Reaktion treten können (Becker, 1960; Müller-Eberhard u. Lepow, 1965). Hierdurch wird das enzymatisch veränderte C'_4 z.T. an den Ag-Ak-Komplex gebunden. Derjenige Teil der enzymatisch veränderten C'_4 -Moleküle, der keine Reaktionspartner gefunden hat, verfällt spontan zu einer Reihe von Degradationsprodukten. Die Reaktion zwischen gebundenem, ("aktiviertem") C'_1 und der Komponente C'_4 führt zum Verschwinden des hämolytisch aktiven C'_4 aus der flüssigen Phase (Opferkuch u. Klein, 1964; Klein u. Burkholder, 1960; Opferkuch u. Müller, 1963).

Das Hinweismaterial für die Annahme, daß die erste Komplement-Komponente bei der Komplementbindung als Enzym in Erscheinung tritt, ist zwischen den Jahren 1955 und 1965 von den Arbeitsgruppen um Becker und um Lepow erarbeitet worden. Becker (1955) sowie Levine (1955) konnten zunächst zeigen, daß

durch einen bekannten Esterasehemmstoff die C'_1 -Aktivität an dem mit Antikörper sensibilisierten Erythrozyten (EA) spezifisch gehemmt werden kann. Das Intermediärprodukt EAC'_1 verliert durch die Behandlung mit DFP (Diisopropylfluosphat) seine Fähigkeit, mit C'_4 zu reagieren. Lepow u. Mitarb. (1956a) konnten dann nachweisen, daß sich von Immunaggregaten nach ihrer Reaktion mit Komplement ein Produkt abdissozieren läßt, das esterolytisch wirkt. Als Substrat für die Esterolyse wurden vornehmlich der Aethylester des Acetyltyrosins (ATEE) und der Methylester des p-Toluolsulfonyl-L-arginins (TAME) verwendet. Später konnte dann Becker (1959) zeigen, daß $EAC'_{1,4,2^-}$ Zellen bei Behandlung mit EDTA (Aethylen-diamintetraacetat) dissoziieren. Im Überstand wurde C'_1 - und esterolytische Aktivität gefunden. Schon vorher hatte sich Lepow (1956b) auf den Standpunkt gestellt, die charakteristische Fähigkeit von gebundenem, also an das Immunaggregat verankertem C'_1 bestehe darin, C'_4 zu inaktivieren, d.h. aus der flüssigen Phase zum Verschwinden zu bringen. Tatsächlich kann man beobachten, daß in dem System $EAC'_1 + C'_4$ das C'_4 aus dem zellfreien Überstand schnell verschwindet (Colli u. Mitarb., 1961). Desgleichen kann man beobachten, daß aus frischem Serum C'_4 verschwindet, sobald ein Komplement-bindendes Immunaggregat zugesetzt wird (Lepow u. Mitarb., 1954). Man stellte nun fest, daß ein C'_4 -Schwund in frischem Serum auch ohne Antigen-Antikörper-Aggregat erfolgen kann. Als "Stellvertreter" für das Antigen-Antikörper-Aggregat kann hier Plasmin in Erscheinung treten. In Plasmin-behandeltem Serum verschwindet binnen kurzem das C'_4 (Lepow u. Mitarb., 1953). Lepow nahm an, daß die "Aktivierung" von C'_1 gegenüber C'_4 nicht nur dann erfolgt, wenn C'_1 an das Immunaggregat gebunden wird. Nach Lepow kann C'_1 auch durch Plasmin "aktiviert" werden; es wird hierdurch in gleicher Weise gegenüber C'_4 wirksam. Die aktivierte, gegenüber C'_4 wirksame Form des C'_1 , wurde als C'_{1a} bezeichnet (Becker, 1959; Borsos u. Mitarb., 1960). Die Vermutung, daß C'_{1a} identisch mit einer

Esterase sei, wurde durch die Beobachtung gefestigt, daß bei der Plasminbehandlung von frischem Serum außer dem Verschwinden von C'_4 eine Zunahme an esterolytischer Aktivität beobachtet werden kann. Lepow u. Mitarb. (1956a, 1956b, 1958) stellten überdies fest, daß ein roh gereinigtes C'_1 -Präparat unter bestimmten physikalisch-chemischen Bedingungen spontan die Fähigkeit acquiriert, angebotene Ester zu hydrolysieren und auch angebotenes C'_4 zu inaktivieren. Auch dieser Vorgang wurde als Umwandlung von C'_1 zur "aktiven" Form C'_{1a} gedeutet (Haines u. Lepow, 1964c). Es wurde angenommen, die Umwandlung verlaufe bei gereinigten Präparaten und unter bestimmten physiko-chemischen Bedingungen spontan. Im Vollserum (Mensch) wird die Umwandlung von C'_1 zu C'_{1a} durch einen hitzelabilen Inhibitor verhindert, der bei der Reinigung eliminiert wird (Lepow u. Leon, 1962; Lepow u. Mitarb. 1963; Haines u. Lepow, 1964a).

Die Quintessenz der "Esterasetheorie" läßt sich folgendermaßen zusammenfassen: Nach der Anschauung von Lepow ist aktiviertes C'_1 als C'_{1a} identisch mit einer Esterase und außerdem identisch mit dem Träger der C'_4 -abbauenden Wirkung, wie sie in Plasmin-behandeltem Serum oder in roh gereinigtem Eoglobulin oder in Dissoziationsprodukten aus Komplement-beladenen Immunaggregaten auftritt. Diese Anschauung wird heute weitgehend akzeptiert, obwohl affirmative Beweise für ihre Gültigkeit bislang noch nicht beigebracht worden sind.

In ihren Kernpunkten beruht die Esterase-Theorie auf drei stillschweigend adoptierten Voraussetzungen:

- 1). Die Konversion von C'_1 zu C'_{1a} wird als irreversibler Vorgang aufgefaßt. Dies bedeutet im Speziellen, daß nach Kontakt mit einem Antigen-Antikörper-Aggregat die Aktivierung des C'_1 endgültig ist; nach Abdissoziation erfolgt keine rückläufige Konversion des C'_{1a} zu C'_1 .

Abdissoziiertes C'_1 muß also stets esterolytisch wirken und C'_4 inaktivieren.

- 2). Ein Abbau von C'_4 wird stets als ein Zeichen dafür gewertet, daß im System aktiviertes C'_1 vorhanden ist. Andere Faktoren oder Systeme, mit der Fähigkeit C'_4 zu inaktivieren, werden nicht in Betracht gezogen.
- 3). C'_1 wird als komplexes Makromolekül aufgefaßt, welches bei der Dekomplementierung von frischem Serum durch Antigen-Antikörper-Aggregate als Ganzes aus dem Überstand verschwindet. Ein Zerfall des Makromoleküls in seine Untereinheiten erfolgt nur durch EDTA.

Diese drei Sätze müssen akzeptiert werden, wenn die bisher vorliegenden Befunde im Sinne Lepows gedeutet werden sollen. Im folgenden soll der Versuch gemacht werden, die Gültigkeit dieser Voraussetzungen experimentell zu prüfen. Dabei kann man von dem Gedanken ausgehen, daß bei verschiedenen Tierspezies verschiedene Verhältnisse vorliegen können, die zu einer Klarstellung beitragen mögen. Bisher sind die Studien an C'_1 fast ausschließlich an Humanserum (Lepow) und an Meerschweinchen Serum (Becker) vorgenommen worden. Die Möglichkeit besteht, daß bei diesen beiden Spezies für die Reinigung des C'_1 besonders ungünstige Verhältnisse vorliegen. Theoretisch erscheint es durchaus möglich, daß in den Präparaten von Lepow und von Becker drei verschiedene Wirkstoffe nebeneinander existieren, nämlich

- 1). C'_1
- 2). ein von C'_1 und von C'_{1a} verschiedener C'_4 -abbauender Faktor und
- 3). eine Esterase.

Die Möglichkeit muß erwogen werden, daß gerade beim Menschen und beim Meerschweinchen diese drei Faktoren physiko-chemisch

sehr ähnlich sind; es ist denkbar, daß bei anderen Tieren ihre Separierung gelingt. Dieser Gedanke läuft auf die Frage hinaus, ob es gelingt, aus dem Komplex Antigen-Antikörper-C'₁ bei verschiedenen Tierarten freies C'₁ abdissoziieren und eventuell weiter zu reinigen. Wenn die drei genannten Voraussetzungen der Lepow'schen These zutreffen, dann müßte man erwarten, daß für die Aktivitäten "C'₁"; "C'₄-abbauende Wirkung" und "Esterolyse" bei verschiedenen Tieren und Präparaten ein konstantes Verhältnis besteht. Um dieser Frage nachzugehen ist es notwendig, eine Methode auszuarbeiten, die hochaktive Präparate von abdissoziiertem C'₁ liefert. Ein Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich dementsprechend mit der Möglichkeit, C'₁ spezifisch zu reinigen.

Die bisherigen, rein empirisch begründeten Versuche, durch Dissoziation von in toto gebundenem Komplement C'₁ zu gewinnen, haben Präparate geliefert, deren C'₁-Aktivität aus den Angaben der Autoren nicht beurteilt werden kann (Lepow u. Mitarb. 1956a; Becker 1959). Zudem ist es nicht sicher, ob aus dem gebundenen Gesamt-Komplement nicht auch andere Faktoren als die C'₁-Komponente mit abdissoziieren und das Präparat verunreinigen. Bei den im folgenden geschilderten Versuchen gingen wir von der Tatsache aus, daß ein hochaktives Intermediärprodukt der Form EAC'₁ hergestellt werden kann; dieses Produkt enthält nur C'₁ und keine andere gebundene Komplement-Komponente (Klein, 1960; Opferkuch u. Klein, 1963). Unter Verwendung des gleichen Verfahrens wurde ein Antigen-Antikörper-C'₁-Komplex hergestellt und als Objekt für die Dissoziationsversuche benutzt.

Im ersten Teil der Arbeit wird ausgeführt werden, daß sich auf diese Weise eine hochwirksame Reinigung von C'₁ bewerkstelligen läßt und daß diese Reinigung des C'₁ für alle untersuchten Tierspezies anwendbar ist. Im zweiten Teil der Arbeit soll gezeigt werden, daß bei den durch Dissoziation

gewonnenen C'_1 -Präparaten weitere Reinigungsschritte unter Anwendung proteinchemischer Verfahren möglich sind. Es wird dargelegt werden, daß sich bei diesen Reinigungsverfahren die drei Aktivitäten " C'_1 ", " C'_4 -inaktivierende Wirkung" und "Esterolyse" keineswegs gleichsinnig, sondern gänzlich unabhängig voneinander verändern. Im dritten Teil der Arbeit werden einige zusätzliche Beobachtungen mitgeteilt, die eine von der Esterasetheorie abweichende Erklärung für den Mechanismus der Interaktion zwischen EAC'_1 und C'_4 nahelegen.

MATERIAL UND METHODEN

Puffer. Folgende Lösungen wurden verwendet: Veronalpuffer nach Mayer u. Mitarb. (1948); Phosphatpuffer pH 5,4; 0,02 m; Citratpuffer (0,12 M NaCl + 0,03 M NaCitrat; pH 7,2); Alsever-Lösung (isotonische Glucoselösung mit Citratzusatz); physiologische Kochsalzlösung (0,85 %). Die Herstellung der verwendeten Lösungen ist bei Klein u. Colli (1961) beschrieben.

Erythrozyten. Hammelblut wurde im gleichen Volumen einer Alseverlösung aufgefangen, anschließend vier mal in Citratpuffer gewaschen und die Suspension photometrisch auf 5×10^9 Zellen/ml eingestellt (Klein u. Colli, 1961). Bei $+4^{\circ}$ sind die Zellen etwa 30 Tage haltbar.

Hämolysin (Amboceptor). Es wurde Amboceptor der Behringwerke (4000 Einheiten/ml) benutzt.

Komplement und Komplementfragmente. Die Gewinnung und Aufbewahrung von Komplement bzw. die Methoden zur Herstellung und Prüfung der Komplementreagentien sind bei Klein u. Colli (1960); Colli u. Mitarb. (1961) sowie bei Opferkuch u. Mitarb. (1961) zu finden. Als inkomplette Komplementpräparate (Komplementfragmente) werden verwendet: Euglobulin, Pseudoglobulin, Äther-behandeltes Serum, R_1 und R_4 . Das Euglobulin enthält in frischem Zustand das gesamte C'_1 und wechselnde Mengen von C'_4 , hingegen aber kein C'_2 . In dieser frischen Form wird das Euglobulin als "M" symbolisiert. Läßt man Euglobulin 2 Stunden bei einem pH von 7,6 und einer Molarität von 0,15 im Wasserbad stehen (37°), so verschwindet das C'_4 völlig, während das C'_1 vollkommen erhalten bleibt. Darüber hinaus hat das so behandelte Mittelstück die Fähigkeit acquiriert, freies ungebundenes C'_4 zu inaktivieren. Ein Mittelstück, welches durch "Alterung" in dieser Form gewonnen

wird, soll im Folgenden mit dem Symbol "M⁺" versehen werden. Die Pseudoglobuline enthalten kein C'₁, dafür aber das gesamte C'₂ des Serums. Daneben enthält diese Fraktion große Mengen von C'₄. Die Pseudoglobuline werden als "Endstück" (e) bezeichnet. Durch Aetherbehandlung von frischem Serum wird die Komponente C'₄ zerstört, während die Komponente C'₁ voll erhalten bleibt. Das C'₄-freie Komplement-Fragment (als C'_{Aether} bezeichnet), interagiert mit Antigen-Antikörper-Aggregaten. Die Reaktion bleibt aber auf der Stufe Ag-Ak-C'₁ stehen, da das C'₄, welches die Bindung von C'₂ vermitteln muß, fehlt. Das Präparat C'_{Aether} figuriert also gegenüber einem Antigen-Antikörper-Aggregat als spezifischer C'₁-Donator (Klein, 1960).

Die als R₁ und R₄ bezeichneten Fragmente dienen zum Nachweis von C'₁ bzw. C'₄. Als R₁ bezeichnet man ein Komplementbruchstück, in dem alle Komponenten außer C'₁ vorhanden sind. R₄ ist ein Komplementfragment mit einer C'₄ beschränkten Lücke (siehe Kabat u. Mayer, 1961).

Herstellung eines gereinigten C'₄ aus Meerschweinchen-Serum

8 g TEAE-Zellulose der Kapazität 0,81 (Serva, Heidelberg) wurden über Nacht mit 0,02 m Phosphatpuffer ("Startpuffer", pH 7,2) in einer Säule (Durchmesser 2,5 cm) equilibriert. Die Zellolosesäule hat eine Höhe von 8 - 10 cm. 10 ml Meerschweinchen-Endstück wird auf pH 7,2 eingestellt und auf die Säule aufgetragen. Das nicht haftende Eiweiß wird mit dem Startpuffer ausgewaschen. Die Elution erfolgt mit einem kontinuierlichen NaCl-Gradienten bis 0,3 m NaCl im Startpuffer. Ab 0,14 m NaCl ist im Effluens C'₄ nachzuweisen. Die so gewonnenen Fraktionen enthalten bis zu 640 Einheiten C'₄. Das Präparat ist bei +4° C etwa 14 Tage lang haltbar. Durch Einfrieren und Auftauen verliert es schnell seine Aktivität.

Titration der antikomplementären Wirkung: Zur Beurteilung der C'_4 -inaktivierenden Wirkung wurde eine geometrische Verdünnungsreihe (Volumen 0,2 ml, Verdünnungsfaktor 2) des zu prüfenden Präparates hergestellt und mit der gleichen Menge einer C'_4 -Verdünnung von 2 hämolytischen C'_4 -Einheiten pro ml gemischt. Das System wurde 10 Min. bei 37° inkubiert. Anschließend wurde 0,2 ml EA und dann 0,2 ml R_4 zugegeben und nochmals 30 Min. lang bei 37° bebrütet. Der reziproke Wert derjenigen Serumverdünnung, bei der noch keine 100%-ige Lyse eingetreten war, wurde als C'_4 -inaktivierender Titer angegeben.

Titration von C'_1 . Wie bei der Titration der C'_4 -inaktivierenden Wirkung wurde eine geometrische Verdünnungsreihe von 0,2 ml des zu prüfenden Präparates hergestellt, und mit der gleichen Menge EA vermischt. Anschließend wurde das System zehn Minuten bei 37° inkubiert. In dieser Zeit bildet sich der Komplex EAC'_1 . Danach wurde in jedes Röhrchen 0,2 ml R_1 und 0,2 ml Veronalpuffer gegeben und 30 Minuten bei 37° gehalten. Als hämolytischer C'_1 -Titer wurde der reziproke Wert derjenigen Verdünnung des zu prüfenden Präparates angegeben, bei welcher noch eine 100 %-ige Lyse abzulesen war.

Dekomplementierung von Serum bzw. von C'_1 -Präparaten. Zur Dekomplementierung wird Serum oder ein C'_1 -Präparat mit Stroma-Amboceptor-Komplex (SA) 1 Stunde bei 0° inkubiert (außer bei Präparaten von humanem Komplement; diese müssen bei $+27^\circ$ bebrütet werden, da sich C'_1 in der Kälte nicht an den Antigen-Antikörper-Komplex anlagert). Mit einem Betrag von $10 \cdot 10^9$ SA kann 1 ml frisches Serum im Hinblick auf seinen C'_1 -Gehalt vollständig erschöpft werden.

Celluläre Intermediärprodukte. Die Präparate EA und EAC'_1 wurden entsprechend den Vorschriften von Klein (1960) hergestellt. Alle Suspensionen von Zellen bzw. Intermediärprodukte wurden auf eine Dichte von $0,5 \times 10^9$ Zellen/ml eingestellt.

Nicht-celluläre Immunkomplexe: Hammelerythrozyten werden mit 60 Einheiten Amboceptor pro 10^9 Zellen sensibilisiert und anschließend mit Glyzerin lysiert (Klein u. Colli, 1960). Nach Waschung werden die so erhaltenen Stroma-Amboceptor-Komplexe (SA) mit einem C'_1 -Donator zusammen inkubiert, anschließend erneut gewaschen und resuspendiert. Der so erhaltene SAC'_1 -Komplex inaktiviert spezifisch C'_4 (Opferkuch u. Klein, 1964).

Beurteilung der Esteraseaktivität. Jeweils 0,3 ml der Präparate wurden mit 1,5 ml einer Lösung von TAME (Serva, Heidelberg) bzw. ATEE (Fluka, Buchs/Schweiz) versetzt. Die Molartität der angebotenen Esterlösung variierte zwischen 0,01 und 0,05. Das Substratoptimum wurde jeweils in einem Vorversuch ermittelt. Das Versuchs-pH betrug 8,2. Dies ist, wie sich ergab, für beide Substrate und für alle Tierspezies das Optimum. Die Mischung wurde bei 37° bebrütet und die durch Hydrolyse freigesetzte Säure mit Lauge titrimetrisch erfaßt. Die Laugentitration wurde mit dem Kombititrator 3D der Firma Metrohm durchgeführt. Damit ist eine kontinuierliche Registrierung des Laugenverbrauches möglich. Der Laugenverbrauch pro Zeiteinheit ist als Maß für die Fermentaktivität anzusehen. Bei richtiger Wahl des Substrat-Fermentverhältnisses entsteht durch einen gleichmäßigen Laugenverbrauch eine lineare Kurve. Nur bei diesem Kurvenverlauf ist eine echte Aussage über die Fermentaktivität zu machen. Das optimale Substrat-Fermentverhältnis zeigt nicht nur bei den verschiedenen Tieren, sondern auch bei den einzelnen C'_1 -Präparaten deutliche Unterschiede. Als optimale Substratkonzentration wurde für Meerschweinchen und Human- C'_1 im Hinblick auf TAME der Wert 0,05 m ermittelt. Bei ATEE können nur Konzentrationen unter 0,01 m verwendet werden. Das Substrat muß zuerst in absolutem Alkohol gelöst werden und kann dann mit physiologischer NaCl verdünnt werden; bei höheren Konzentrationen als 0,01 m fällt ATEE bei Verdünnung des Alkohols wieder aus. Durch Zugabe von Ca^{++} - und Mg^{++} wird, wie Vor-

versuche ergaben, die Aktivität des Enzyms erhöht. Als optimal erwies sich eine Konzentration von 0,00015 m Ca^{++} und 0,0005 m Mg^{++} .

Bei der Beurteilung des Laugenverbrauches tritt die Kohlensäure der Luft als Fehlerquelle in Erscheinung. Aus diesem Grunde wurde das Substrat-Enzymgemisch während der Titration mit einem kontinuierlichen Fluss von reinem, vorgewärmten Stickstoff durchperlt. Das Reaktionsgemisch wird in der auf 37° gehaltenen Küvette durch einen Magnetrührer in ständiger Bewegung gehalten. Die Titration erfolgte mit 0,01 m NaOH. Die Reaktionstemperatur betrug 37°, das pH 8,2. Als Maß für die Enzymaktivität wird der Verbrauch an Lauge angegeben, der unter optimalen Verhältnissen (pH 8,2; 37° C; optimale Substratmenge) innerhalb 30 Min. registriert wird.

Im Verhältnis zu den bisher verwendeten Methoden (Ratnoff u. Lepow, 1957; Lepow, 1959; Becker, 1961; Haines u. Lepow, 1964c) bietet das eben beschriebene Verfahren eine Reihe von Vorteilen: Unsere Methode gibt sehr scharf reproduzierbare Resultate und ist wesentlich empfindlicher. Dies erlaubt es, den Zeitraum der Messung auf 30 Min. zu beschränken und den streng linearen Verlauf des Laugenverbrauchs zu kontrollieren.

Ultrazentrifugierung. Wir lehnten uns an die Technik von Brakke (1955) an. Es wurden vier Versuche angesetzt. Sechs Saccharoselösungen von jeweils abgestufter Konzentration (5 - 30%, 0,8 ml von jeder Lösung) wurden in einem Zentrifugen-Kunststoffgefäß vorsichtig übereinander geschichtet. Der Stufengradient wurde über Nacht im Eisschrank gehalten, um durch Diffusion einen kontinuierlichen Gradienten zu erzielen. Auf die Oberfläche des mit dem Gradienten beschickten Zentrifugenröhrchens wurden vorsichtig 0,2 ml des zu prüfenden Präparates gegeben und das Ganze mit 0,15 ml Paraffinöl abgedichtet. Die Zentrifugation wurde 15 Stunden

bei 30 000 Umdrehungen pro Minute durchgeführt. Anschließend wurde durch Einstich an der Gefäßkuppe das Röhrchen entleert. Jeweils 5 Tropfen wurden gesondert aufgefangen. Die Fraktionen wurden gegen Veronalpuffer dialysiert und auf C'_{10} geprüft.

Gel-Filtration. Wir benutzten das Verfahren nach Porath u. Mitarb. (1959). Sephadex (G 200; G 150 sowie G 100; Pharmacia Uppsala) wurde 24 Stunden in einem 0,01 m Na-Phosphatpuffer von pH 7,4 mit einem Zusatz von 0,15 m NaCl gequollen. Für die Auftrennung in Gegenwart von EDTA wurde dem Puffer 0,01 ml Na_2 EDTA zugegeben. Anschließend wurde eine Säule von 4,8 cm Durchmesser und 90 cm Höhe gefüllt und 15 Stunden mit dem Puffer äquilibriert. Es wurden 30 ml der zu fraktionierenden Serumcharge (Eiweißgehalt 120 - 750 mg/ml) aufgetragen. Das Eiweiß wurde mit dem Puffer durchgeschwemmt und über eine automatisch arbeitende, photometrische Registrierung des Eiweißgehaltes bei 280 m μ in 5 ml - Fraktionen aufgefangen. (Automatischer Fraktionssammler der Firma LKB, Stockholm). Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug etwa 1 Tropfen in 3 Sec.

Elektrophorese. Die Präparate wurden nach den üblichen Verfahren der Elektrophorese aufgetrennt. Als Träger kamen zur Verwendung: Papier, Stärke, Pevikon und Agargel. Nur die Elektrophorese in Pevikon erbrachte verwendbare Resultate. Es wurde ein Pevikonblock nach Müller-Eberhard und Kunkel (1956) hergestellt. Der Block hatte eine Länge von 18 cm, eine Breite von 16 cm und eine Stärke von 0,5 cm. Der verwendete Puffer hatte folgende Zusammensetzung: 9,78 g Natriumbarbiturat, 6,14 g Natriumacetat, 60 ml 0,1 n HCl auf 1000 ml aqua dest. - Das Pevikon wurde in dem Puffer aufgeschwemmt, in die Form gegossen und die überstehende Flüssigkeit abgesaugt. Die Elektroden wurden in 0,5 m Barbituralpuffer von

pH 8,6 eingetaucht und über eine feuchte Brücke aus Zellstoff mit dem Pevikonblock verbunden. Es wird eine Spannung von 100 Volt bei 50 mA angelegt und 16 Stunden bei Zimmertemperatur aufgetrennt. Während der Auftrennung wird der Block durch eine Kühlschlange durch Leitungswasser gekühlt. Nach der Auftrennung wird der Pevikonblock in 0,5 cm breite Streifen geschnitten und das Eiweiß mit Veronalpuffer eluiert. Es wird auf C'₁-Aktivität und C'₄-inaktivierende Wirkung titriert.

Eiweißgehalt: Der Eiweißgehalt wurde nach der Methode von Folin - Ciocalteu (1927) in der Modifikation von Lowry u. Mitarb. (1951) bestimmt.

ERGEBNISSE

I. Spezifische Reinigung von Meerschweinchen-C'₁ durch Dissoziation des Antigen-Antikörper-C'₁-Komplexes

Durch die Untersuchungen von Klein (1960) ist bekannt, daß C'₁ isoliert, d.h. ohne Beteiligung anderer Komplement-Komponenten an sensibilisierte Zellen angelagert werden kann. Das Produkt der Reaktion, die EAC'₁-Zelle ist gegenüber einem R₁-Präparat hochaktiv. Die Technik der EAC'₁-Herstellung wurde auf die Herstellung von Antigen-Antikörper-C'₁-Komplexe übertragen. Als Donator für isoliertes C'₁ wurde aetherbehandeltes Komplement (C'_{Aether}) verwendet. Als Akzeptor für C'₁ figurierte Stroma-Antikörper-Komplex (SA). Neben dem Präparat C'_{Aether} wurde auch ein antikomplementär gewordenes Eoglobulin ("konvertiertes Mittelstück", M⁺) als C'₁-Donator gebraucht. Es wurde der C'₁-Titer des C'₁-Donators vor und nach dem Kontakt mit dem SA-Komplex bestimmt.

1). Verschwinden von freiem C'₁ nach Behandlung mit SA-Komplexen

Jeweils 5 ml von unverdünntem C'_{Aether} werden mit der gleichen Menge einer SA-Suspension (Dichte $10 \times 10^9/\text{ml}$) gemischt. Die Reagentien werden vor der Mischung auf 0° gekühlt. Das Reaktionsgemisch wird eine Stunde bei 0° gehalten und dann in der Kälte zentrifugiert. Der Überstand wird auf C'₁-Aktivität titriert. Als Kontrolle wurde der gleiche Versuch in Gegenwart von 0,01 m EDTA ausgeführt. Hierbei wurde das C'_{Aether}-Präparat vor der Mischung mit SA durch Zugabe von 0,5 ml einer 0,2 m Lösung von EDTA entionisiert. Nach der Absorption und Zentrifugierung wurde der Überstand mit 0,5 ml einer 0,2 m CaCl₂-Lösung recalcifiziert. Eine andere Kontrolle wurde ohne SA angesetzt: Das C'_{Aether}-Präpa-

rat wurde an Stelle der SA-Suspension mit der gleichen Menge Veronalpuffer gemischt. Neben dem Präparat C'Aether wurde in gleicher Weise und mit den gleichen Kontrollen das Präparat M⁺ geprüft. Tabelle 1 veranschaulicht das Resultat des Versuchs.

Tabelle 1

C' ₁ -Donator	C' ₁ -Titer des Donators	
	vor Absorption	nach Absorption
C'Aether	1280	20
C'Aether EDTA	160	160
M ⁺	640	8
M ⁺ EDTA	160	160

Man sieht in Tabelle 1, daß eine Behandlung (Absorption) mit der SA-Suspension den C'₁-Titer des Donator-Präparates auf einen Bruchteil seines Ausgangswertes herabsetzt. Die EDTA-Kontrollen zeigen vor und nach der Absorption gleiche Titerwerte. Der C'₁-Titer wird durch EDTA allerdings selbst herabgesetzt. Dies beruht auf einer langsamen Inaktivierung des C'₁ durch EDTA.

2). Reinigung von C'₁ durch Dissoziation des SAC'₁-Komplexes mit hypertonischer NaCl-Lösung

10 ml unverdünntes C'Aether wird vorgekühlt, mit der gleichen Menge einer vorgekühlten SA-Suspension (10 x 10⁹/ml) vermischt und eine Stunde bei 0° gehalten. Anschließend wird zentrifugiert. Das Sediment wird dreimal mit eisgekühltem Veronalpuffer gewaschen.

Das Sediment wird zum Schluß in 10 ml einer 8%-igen NaCl-Lösung aufgenommen.¹⁾ Die Suspension bleibt bei Zimmertemperatur 10 Minuten stehen und wird einige Male aufgerührt. Anschließend wird zentrifugiert; das Sediment wird verworfen und der Überstand in der Kälte (+4°C) gegen einen 0,02 m Phosphatpuffer von pH 5,4 dialysiert. Es fallen hierbei die Euglobuline als kaum sichtbares Präzipitat aus. Die präzipitierten Euglobuline werden abgeschleudert und in 1 ml Veronalpuffer aufgenommen. Es ergibt sich bei dieser Methode bei einem Proteingehalt von 400g/ml ein Titer von etwa 2500 - 5000 Einheiten C'₁/ml.

Tabelle 2

NaCl-Konzentration in %	C' ₁ -Titer des Überstandes nach NaCl-Behandlung
4	48
6	96
8	192
10	96
12	96
15	60

Das geschilderte Reinigungsverfahren stellt das Resultat von systematischen Untersuchungen dar. In diesen Untersuchungen wurden die wesentlichen Parameter der Reinigungsprozedur festgestellt und die Optimalwerte ermittelt. Tabelle 2 zeigt zum Beispiel, daß eine optimale Absprengung von C'₁ bei 8 %

1) Durch Zugabe von 0,00015 m CaCl₂ und 0,0005 MgCl₂ zur NaCl-Lösung kann bei der Dissoziation eine Erhöhung der C'₁-Ausbeute bewirkt werden. Die Erhöhung beträgt etwa eine Titerstufe.

NaCl-Lösung erfolgt. Weiterhin konnte festgestellt werden, daß die Dissoziation spätestens nach 15 Minuten beendet ist; sie verläuft bei 0° , bei Zimmertemperatur und bei 37° gleich. Bei wiederholter Behandlung des gleichen SAC'_1 -Komplexes mit 8% NaCl kann noch einmal aktives C'_1 abgespalten werden. Die Dissoziation ist also das erste Mal unvollständig. Insgesamt können ungefähr 50 % des aus dem Donator weggebundenen C'_1 als aktives Dissoziationsprodukt des Komplexes SAC'_1 wieder gewonnen werden. Es wurde in Kontrollversuchen festgestellt, daß sich in einem Milieu von 8% NaCl, wie wir es zur Absprengung benutzen, aus SAC'_1 keine nachweisbaren Mengen von Kaninchen-Antikörper absprengen lassen: Das Dissoziationsprodukt zeigt keine sensibilisierende Wirkung gegenüber Erythrozyten und auch kein spezifisch präzipitierbares Kaninchen-Antigen.

Tabelle 3

Präparat	ml	Eiweiß- gehalt	C'_1 - Titer	Protein pro Ein- heit C'_1	Reinigungs- koeffizient
Donator M^+	125	100 mg%	1:160	0,062	
Dissoziationspro- dukt vor Euglobu- linfällung	50	20 mg%	1:160 bis 1:320	0,008	7,7
Dissoziationspro- dukt nach Euglo- bulinfällung	5	40 mg%	1:2500	0,0017	27

Tabelle 3 zeigt den Reinigungsgrad für die zwei Stufen des Reinigungsvorganges. Als Donator für die Bildung des SAC'_1 -Komplexes wurde hier das Präparat M^+ verwendet. Man sieht, daß die spezifische Reinigung durch einfache Dissoziation einem 7,7-fachen Reinigungseffekt entspricht. Unterwirft man das Dissoziationsprodukt aber zusätzlich noch der Euglobulin-fällung, so resultiert, bezogen auf das ursprünglich verwendete

Euglobulin, ein 270-facher Reinigungseffekt. Auf das Serum bezogen ergibt sich damit ein Reinigungskoeffizient von 1300, wenn man berücksichtigt, daß das Euglobulin bei einem fünfzigstel des Serumproteins das gesamte C'_1 enthält.

3). Dissoziation des SAC'_1 -Komplexes durch EDTA

Es wurde wie oben beschrieben ein SAC'_1 -Komplex hergestellt und in zwei Portionen geteilt. Die eine Charge wurde als Sediment in einer Lösung von 0,02 m EDTA, die andere als Sediment mit 8%-iger NaCl-Lösung aufgenommen. Die Mischungen wurden 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend zentrifugiert. Beide Überstände wurden gegen Veronalpuffer dialysiert und anschließend auf gleiches Volumen gebracht. Es wurde eine C'_1 -Titration mit beiden Chargen ausgeführt.

Es zeigte sich bei diesen Versuchen, daß die Ausbeute an aktivem C'_1 bei der NaCl-Abspregung das doppelte bis vierfache desjenigen Titors beträgt, der bei Abspregung mit EDTA erhalten wird. So betrug zum Beispiel in einem Versuch die C'_1 -Ausbeute bei Abspregung mit NaCl 512 Einheiten C'_1 , während sich bei der gleichzeitig erfolgenden Abspregung mit EDTA 128 Einheiten C'_1 ergaben. Dieser Befund zeigt, daß eine hypertonische Kochsalzlösung als Abspregmittel der EDTA-Lösung überlegen ist: Der Befund steht im übrigen in einem gewissen Widerspruch zu der Mitteilung von Müller-Eberhard und Kunkel (1961) über die Natur der 11 S Komponente. Nach den Befunden von Müller-Eberhard und von Lepow muß man folgern, daß aus einem SAC'_1 -Komplex durch EDTA überhaupt nur inkomplettes C'_1 abdissozierbar ist; es wäre in diesem Sinne zu erwarten, daß als Produkt der Dissoziation von SAC'_1 einerseits der Komplex SAC'_1q und andererseits die beiden Unterkomponenten C'_{1r} und C'_{1s} entstehen. Dieser Sachverhalt wird noch in der Diskussion behandelt werden.

II. Verwendbarkeit der C'₁-Reinigungsmethode für das C'₁, verschiedener Säugetiere

Die bisher mitgeteilten Befunde beziehen sich, wie erwähnt, auf Meerschweinchenserum. Es wurden systematisch Versuche unternommen, das C'₁ von verschiedenen Säugetieren mit der gleichen Methode zu reinigen und eventuell notwendig werdende Veränderungen in die Methode einzubauen. Es zeigte sich bei diesen Versuchen, daß es ohne Änderungen des Verfahrens gelingt, mit der angegebenen Methode das C'₁ folgender Tierespezies spezifisch zu reinigen: Pferd, Rind, Hammel, Ziege, Schwein, Kaninchen, Hamster und Ratte. Entsprechend dem zum Teil sehr hohen C'₁-Gehalt im Serum einiger Tiere (Schwein, Pferd) wurden zum Teil sehr hochtitrige Dissoziationsprodukte erhalten. Bei menschlichem C'₁ ergab sich eine Schwierigkeit: Es gelang weder bei 0° noch bei 37° einen brauchbaren SAC'₁-Komplex herzustellen. Dies steht im Einklang mit den Angaben von Leon u. Lepow (1962). Durch Versuche wurde für unsere Bedingungen festgestellt, daß sich für Human-C'₁ der SAC'₁-Komplex optimal bei einer Temperatur von 27° bildet. Berücksichtigt man diese Besonderheit, so ergeben sich auch beim Human-C'₁ hochtitrige Präparate (siehe weiter unten). Bei den Reinigungsversuchen von C'₁-Präparaten verschiedener Säugetiere wurden als Donatoren die Präparate C'_{Aether} ebenso benutzt wie die Euglobuline. Es ergab sich dabei kein prinzipieller Unterschied. Allerdings konnte festgestellt werden, daß die Euglobuline und auch die C'_{Aether}-Präparate verschiedener Tierespezies (Rind, Hammel, Ziege) im Hinblick auf ihre antikomplementäre Wirkung gewisse Verschiedenartigkeiten aufweisen. Das Euglobulin der Spezies Rind, Hammel und Ziege erlangt auch nach mehrstündiger Bebrütung (37°) in einem Milieu von Veronalpuffer bei pH 7,6 keine antikomplementäre Wirkung, d.h. es ist nicht in der Lage, freie C'₄ zu inaktivieren.

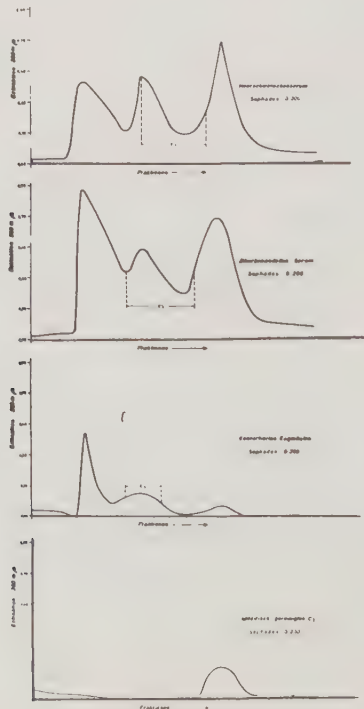
Das gleiche gilt für die Behandlung des Serums mit Aether für die Spezies Rind, Hammel und Ziege. Auf diese Besonderheiten wird in einem späteren Kapitel im Zusammenhang mit der antikomplementären Wirkung und der Esteraseaktivität eingegangen werden.

III. Versuche zur chemisch-physikalischen Charakterisierung der C'_1 -Aktivität von Meerschweinchen-Serum

1). Verhalten in der Gel-Filtration

Vollserum, Euglobulin, aetherbehandeltes Komplement sowie spezifisch gereinigtes C'_1 wurden der Gelfiltration auf Sephadex 200 unterworfen. Es sollte damit versucht werden, eine Vorstellung über die Molekülgröße von C'_1 zu gewinnen.

Bei diesen Versuchen konnte die C'_1 -Aktivität mit großer Regelmäßigkeit in dem zweiten Eiweißgipfel, also zwischen dem Makromolekülgipfel und den Albuminen nachgewiesen werden (Abb. 1).

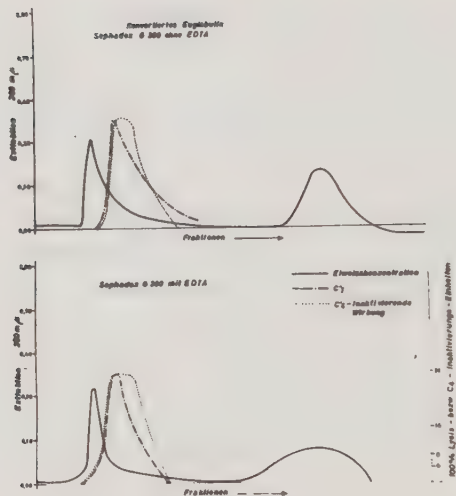


Die Befunde mit Sephadex G 100 und Sephadex G 150 fielen analog aus: An der Säule mit Sephadex G 100 ist die C'_1 -Aktivität im gesamten Verlauf des ersten Eiweißgipfels nachzuweisen, bei Sephadex G 150 im zweiten Teil des ersten Eiweißgipfels.

Im Sinne der von Lepow u. Mitarb. (1963) mitgeteilten Befunde müßte das C'_1 des Meerschweinchens in Analogie zum menschlichen C'_1 in drei Spaltprodukte zerfallen, wenn das als Bindeglied der drei Untereinheiten dienende Calcium durch EDTA eliminiert wird. Es müßte erwartet werden, daß eine Gelfiltration an Sephadex G 200 in Gegenwart von EDTA andere Resultate erbringt als die Filtration in Gegenwart von Ca^{++} -haltigem Veronalpuffer. Wenn durch EDTA tatsächlich eine Dissoziation des C'_1 in drei Untereinheiten erfolgt, so müßte im Gelfiltrat die C'_1 -Aktivität verschwinden; es ist zu erwarten, daß sich die C'_1 -Aktivität nach Recalcifizierung durch Rekombination von drei geeigneten Fraktionen wieder herstellen läßt. Aus diesem Grunde wurde die Gelfiltration in Gegenwart von 0,01 m EDTA in isotonischem Phosphatpuffer ausgeführt.

Abb. 2 zeigt, daß die C'_1 -Aktivitäten mit und ohne EDTA in den gleichen Fraktionen gefunden werden. Die C'_1 -Aktivitäten und die Aktivitäten der antikomplementären Wirkung sind für beide Filtrationsbedingungen etwa gleich groß. Insgesamt ergibt die im Filtrat nachgewiesene C'_1 -Menge etwa im viertel des zur Filtration gelangten C'_1 -Betrages. Die Tatsache, daß EDTA das Verhalten des C'_1 in der Gelfiltration nicht verändert, steht im Widerspruch zu den oben genannten Thesen der amerikanischen Autoren, nach denen C'_1 in Gegenwart von EDTA in drei Untereinheiten zerfallen soll.

Neben der Charakterisierung des spezifisch gereinigten C'_1 wurde das C'_1 aus Vollserum, C'_1 Aether und Euglobulin der



Gelfiltration unterworfen. Es zeigte sich hierbei stets das gleiche Bild, wie es bei der Gelfiltration von spezifisch gereinigtem C'_1 beobachtet worden war: Die C'_1 -Aktivität erscheint bei Sephadex G 200 nach dem 1. Eiweißgipfel. Hier-nach kann gesagt werden, daß das abgesprengte C'_1 im Hinblick auf seine Molekülgröße keine Veränderungen zum freien C'_1 - etwa im Vollserum - aufweist.

2). Ultrazentrifugierung

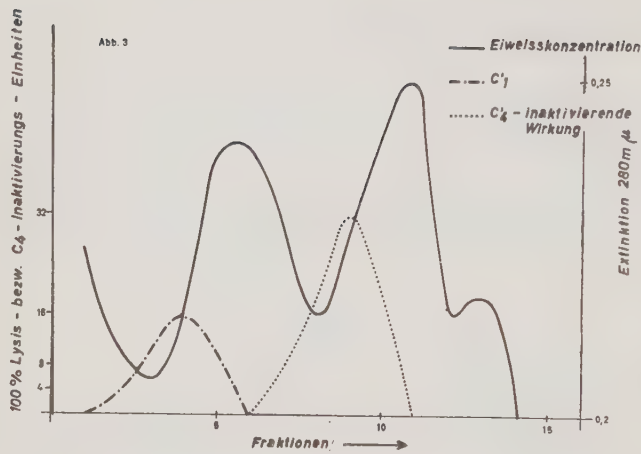
Es wurde gereinigtes C'_1 im Saccharosegradienten (5-30%) bei 30 000 Umdrehungen pro Minute aufgetrennt. - Es ergab sich, daß die C'_1 -Aktivität in keiner einzigen der erhaltenen Fraktionen nachgewiesen werden kann. Eine Rekombination des gesamten Fraktionsmaterials ergab keine Wiederherstellung der Aktivität. Andererseits konnte festgestellt werden, daß ein zwanzigstündiges Verweilen eines aktiven C'_1 -Präparates in 20%-iger Saccharoselösung keine Minderung der Aktivität erbrachte. Die Ursache dieses Verhaltens ist vorläufig nicht zu erklären.

3). Säulen-Chromatographie mit Cellulose

Eine Chromatographie mit DEAE-Zellulose scheitert daran, daß C'_1 ein Euglobulin ist und deshalb bei niederer Ionenstärke nicht aufgetragen werden kann. Fraktionierungen mit der CM-Cellulose (0,15 m) mit steigendem pH-Gradienten (5,5 - 8,0) führten ebenfalls zu keinem brauchbaren Ergebnis: In keiner der gewonnenen Fraktionen war eine C'_1 -Aktivität nachzuweisen; die Rekombination der Fraktionen erbrachte keine Restitution der C'_1 -Aktivität.

4). Präparative Elektrophorese

Es wurde in der Pevikon-Elektrophorese konvertiertes Euglobulin (M^+) aufgetrennt. - Abb. 3 zeigt, daß die C'_1 -Aktivität sehr langsam wandert. Die gegen C'_4 gerichtete Aktivität wandert wesentlich schneller als das C'_1 und läßt sich von ihr vollständig abtrennen. Dieser Befund ist unvereinbar mit der Annahme, die antikomplementäre Wirkung sei die Folge einer spontan eintretenden "Aktivierung" des C'_1 . Dabei sollte betont werden, daß die Pevikon-Elektrophorese in einem Ca^{++} -haltigen Milieu erfolgte.



IV. Die antikomplementäre Wirkung von C'₁-Präparaten

1). Präparate aus Meerschweinchen-Serum

Von den folgenden C'₁-Präparaten des Meerschweinchens wurden Verdünnungsreihen (Volumen 0,2 ml; Faktor 2) von 1:10 bis 1:10 000 hergestellt.

1. Euglobulin (M)
2. Konvertiertes Euglobulin (M⁺)
3. Dekomplementiertes Euglobulin (M dec)
4. Spezifisch gereinigtes C'₁ (Dissoziationsprodukt: DP)
5. Euglobulin von spezifisch gereinigtem C'₁ (Eu_{DP})
6. Dekomplementiertes Euglobulin des spezifisch gereinigten C'₁ (M_{DP}, dec)
7. Aetherbehandeltes Serum (C'_{Aether})
8. Dekomplementiertes, aetherbehandeltes Serum (C'_{Aether}, dec)

Jede Verdünnungsstufe wurde mit 0,2 ml des gereinigten C'₄ gemischt und zehn Minuten bei 37°C bebrütet. Danach wurde durch Zugabe von 0,2 ml EA und 0,2 ml R₄ festgestellt, bis zu welcher Verdünnung des geprüften C'₁-Präparates die Hämolyse ausbleibt. Diese Verdünnung wird als C'₄-Inaktivierungstiter bezeichnet. Außerdem wurde bei allen Präparaten der C'₁-Titer bestimmt.

Aus der Tabelle 4 ist zu ersehen, daß ein mit Antigen-Antikörper-Komplex behandeltes, dekomplementiertes Euglobulin, ohne selbst C'₁-Aktivität zu besitzen, stark antikomplementär ist. Dieser Befund bedeutet, daß die C'₄-inaktivierende Wirkung nicht notwendigerweise mit hämolytisch aktivem C'₁ assoziiert sein muß. Wäre dies der Fall, dann müßte man erwarten, daß ein dekomplementiertes C'₁-Präparat gleichzeitig mit seinem

Tabelle 4

Antikomplementäre Wirkung und C'₁-Aktivität von C'₁-Präparaten des Meerschweinchens

Präparat	C' ₁ -Titer	C' ₄ -Inaktivierungstiter
M	640	20
M ⁺	640	640
M dec	∅	320
C' Aether	1280	1280
C' Aether dec	∅	320
DP	320	640
M _{DP}	2500	5000
M _{DP} , dec	∅	320

C'₁ auch die gesamte C'₄-inaktivierende Wirkung verlieren müßte. Das gleiche gilt für die Dekomplementierung von aether-behandeltem Komplement. Auch hier verschwindet das C'₁ bei der Dekomplementierung vollständig; gleichzeitig ergibt sich nur ein Abfall, nicht aber ein Verschwinden des C'₄-Inaktivierungstiters. Der Abfall des C'₄-Inaktivierungstiters deutet darauf hin, daß sich bei der Behandlung von antikomplementären C'₁-Donatoren mit SA der Träger der antikomplementären Wirkung zusammen mit dem C'₁ an den zur Dekomplementierung verwendeten Immunkomplex gegebenenfalls mit anlagert. Daß neben der spezifischen Bindung des C'₁ an den Antigen-Antikörper-Komplex anderes Material unspezifisch mit adsorbiert wird, ist durchaus zu erwarten. Die Tabelle 4 zeigt

außerdem, daß bei der spontanen Konversion von frischem, nicht antikomplementären Euglobulin (M) zum stark antikomplementären Euglobulin (M^+) der C'_1 -Titer gleich bleibt. Dies bedeutet, daß die Bildung der C'_4 -abbauenden Aktivität nicht auf Kosten von bindungsfähigem und hämolytisch aktivem C'_1 erfolgt. Durch eine unrichtige Titrationsmethode irreführt, hat Lepow angenommen, hämolytisch aktives C'_1 verschwinde während der Konversion und wandle sich in das antikomplementäre Prinzip um. Der obengenannte Befund zeigt demgegenüber, daß das antikomplementäre Prinzip offenbar aus einer von C'_1 verschiedenen Vorstufe entstehen muß.

2). Präparate aus dem Serum anderer Species

Es wurde für Humanserum und dem Serum der in Tabelle 5 aufgezählten Tiere jeweils ein Präparat von frischem Euglobulin und von "gealtertem" Euglobulin hergestellt. Die "Alterung" des Euglobulins erfolgte durch zwei-

Tabelle 5

	Euglobulin		konvertiertes Euglobulin		C' Aether		spezifisch gereinigtes C' ₁	
	C' ₁	C' ₄ = Inakt.	C' ₁	C' ₄ = Inakt.	C' ₁	C' ₄ = Inakt.	C' ₁	C' ₄ = Inakt.
Human	5000	∅	1280	1280	1280	1280	1280	640
Pferd	2500	40	1280	80	5000	160	1280	80
Rind	1280	∅	1280	∅	1280	∅	320	160
Hammel	1280	∅	1280	∅	5000	∅	320	40
Ziege	1280	∅	640	∅	640	∅	40	20
Schwein	5000	∅	2500	10	10000	80	1280	80
Kaninchen	640	80	320	80	640	120	320	160
Hamster	320	640	320	640	1280	1280	320	160
Ratte	1280	640	320	640	640	640	160	1280
MS	640	∅	640	640	640	1280	320	640

stündige Bebrütung bei 37° in physiologischem Milieu bei einem pH von 7,6. Daneben wurden für die genannten Spezies durch spezifische Bindung an Immunkomplexe, Absprengung und nachfolgende Euglobulinfällung hochgereinigte Präparate von C'₁ hergestellt. Es wurden für alle Präparate die C'₁-Titer und die C'₄-Inaktivierungstiter bestimmt. Tabelle 5 enthält die Ergebnisse dieses Versuchs.

Als wichtigstes Ergebnis der Tabelle 5 ist zunächst festzustellen, daß es beim Rind, beim Hammel und bei der Ziege nicht gelingt, durch Aetherbehandlung von Vollserum oder durch "Alterung" der Euglobuline eine antikomplementäre Wirkung zu erzielen. Das Komplement des Schweins verhält sich praktisch ebenso; hier erscheint lediglich nach Aetherbehandlung eine ganz schwache antikomplementäre Wirkung. Die Präparate der übrigen Spezies verhalten sich wie es für das Meerschweinchen beschrieben worden ist: Ihr Euglobulin konvertiert während der "Alterungsbehandlung" spontan zur antikomplementären Aktivität. Aetherbehandlung bewirkt im Vollserum den gleichen Effekt. - Die hochgereinigten C'₁-Präparate zeigen bei allen Spezies neben ihrer C'₁-Aktivität eine antikomplementäre Wirkung. Wichtig erscheint aber, daß bei spezifisch gereinigten Präparaten überhaupt keine Korrelation zwischen der C'₁-Aktivität und dem Grad der antikomplementären Wirkung festzustellen ist. So liefert z.B. die Ratte ein Präparat, welches bei 160 C'₁-Einheiten 1280 C'₄-inaktivierende Einheiten aufweist; auf der anderen Seite liefern das Pferd und das Schwein Präparate, in denen einem hohen C'₁-Titer (1280 C'₁-Einheiten) ein sehr niedriger C'₄-Inaktivierungstiter (80 Einheiten) gegenübersteht. Insgesamt demonstriert die Tabelle 5, daß bei verschiedenen Präparaten die C'₄-inaktivierende Wirkung jede Korrelation zu dem hämolytischen C'₁-Titer vermissen läßt.¹⁾

1) Es erscheint von Wichtigkeit, festzustellen, daß von dem Stroma-Amboceptor-Komplex gelegentlich selbst etwas antikomplementäres Material abgespalten werden kann. Kontrollversuche bei Behandlung von SA mit einer 8%-igen Lösung ergaben niemals mehr als einen antikomplementären Titer von 5 - 10 Einheiten.

3). Herstellung von C'_1 -Dissoziations-Präparaten des Meerschweinchens unter besonderen Milieubedingungen

Bei den bisher beschriebenen, durch Dissoziation von SAC'_1 -Komplex gewonnenen C'_1 -Präparaten ist neben der C'_1 -Aktivität stets auch die antikomplementäre Wirkung festzustellen. Bei den Präparaten des Meerschweinchens ist diese antikomplementäre Wirkung relativ hoch; sie beträgt in der Regel das Zweifache des jeweiligen C'_1 -Titers. Die bisher angestellten Versuche haben aber den Verdacht, die C'_1 -Aktivität sei von der C'_4 -inaktivierenden Wirkung unabhängig, verstärkt. Es ist wahrscheinlich, daß wenigstens ein Teil der antikomplementären Wirkung bei den C'_1 -Dissoziationspräparaten darauf beruht, daß die zur spezifischen Bindung von C'_1 benutzten SA-Komplexe neben dem C'_1 noch anderes, antikomplementäres Material aus dem Donator in unspezifischer Form binden und bei der Dissoziation mit dem C'_1 zusammen abgeben. Es besteht die Möglichkeit, daß bei entsprechender Wahl der Milieubedingungen die Interaktion zwischen SA und dem C'_1 -Donator so verläuft, daß die im System zusätzlich vorhandenen, antikomplementär wirkenden Stoffe nicht mitgebunden werden, während das C'_1 gebunden wird. Dementsprechend wurden Versuche angestellt, in System $SA + C'_1$ -Donator die Ionenstärke und das pH zu variieren. Die unter verschiedenen Bedingungen angefallenen SAC'_1 -Komplexe wurden der Dissoziations-Prozedur unterworfen. Das dabei entstehende Dissoziationsprodukt wurde jeweils auf den C'_1 -Titer und auf C'_4 -inaktivierende Wirkung getestet. Nach einigen Vorversuchen erwies sich folgende Versuchsanordnung als aufschlußreich:

10 ml Meerschweinchenserum werden gegen 0,02 m Phosphatpuffer von pH 5,4 dialysiert. Das ausgefallene Euglobulin wird abgeschleudert und mit dem Dialysepuffer dreimal gewaschen. Anschließend wird das Eu-

globulin mit 5 ml einer 0,3 m NaCl-Lösung aufgenommen; die 0,3 m NaCl-Lösung wird vorher mit 0,02 m Phosphatpuffer auf pH 5,8 eingestellt und enthält außerdem Ca^{++} - und Mg^{++} -Ionen in der gleichen Konzentration wie der sonst benutzte Veronalpuffer. Das aufgenommene Euglobulin wird von dem nicht gelösten Eiweiß durch Zentrifugieren befreit. Eine Probe davon wird isotonisiert und auf ihren C'_1 -Gehalt sowie auf ihre C'_4 -inaktivierende Wirkung titriert. - 10 ml einer Stroma-Amboceptor-Suspension (Dichte 10×10^9 ml) werden zentrifugiert; das Sediment wird mit 10 ml der oben genannten 0,3 m NaCl-Lösung aufgenommen. Die so erhaltene SA-Suspension wird nun mit der zubereiteten Euglobulinlösung nach Vorkühlung gemischt und eine Stunde bei 0° gehalten. Anschließend wird die Mischung zentrifugiert. Der Überstand wird isotonisiert und auf seinen C'_1 -Gehalt sowie auf seinen Gehalt an C'_4 -inaktivierendem Prinzip titriert. Das Sediment - in der Tabelle 6 als SAC'_1 (0,3 m) bezeichnet - wird mit der 0,3 m Kochsalzlösung zweimal gewaschen und dann zur Dissoziation in 5 ml einer 8%-igen NaCl-Lösung aufgenommen. Die Suspension wird 15 Minuten bei Zimmertemperatur gehalten und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wird 1:8 mit aqua dest. verdünnt und auf C'_1 -Aktivität sowie auf antikomplementäre Wirkung untersucht.

In einem parallel laufenden Ansatz wird die gleiche Menge SAC'_1 im Milieu von 0,3 m NaCl-Lösung hergestellt und gewaschen und schließlich in der gleichen Lösung wieder aufgenommen. 5 ml dieses Präparates werden mit 5 ml eines gereinigten Meerschweinchen- C'_4 -Präparates (8 - 16 Einheiten C'_4 /ml) gemischt und eine Stunde bei Zimmertemperatur belassen. Vor der Mischung wird das C'_4 -Präparat gegen die 0,3 m NaCl-Lösung dialysiert. Die Mischung wird zentrifugiert, das Sediment

- in der Tabelle 6 als $SAC'_1{}_{1,4}$ (0,3 m) bezeichnet - wird mit der 0,3 m NaCl-Lösung zweimal gewaschen und schließlich in 5 ml einer 8%-igen NaCl-Lösung zur Dissoziation aufgenommen. Der Überstand, der nach Abschleudern aus der Mischung $SAC'_1 + C'_4$ erhalten wird, dient zur Titration von C'_4 . Diese Titration soll darüber Aufschluß geben, ob unter den Bedingungen, wie sie die 0,3 m NaCl-Lösung bietet, eine spezifische Reaktion zwischen $SAC'_1 + C'_4$ überhaupt möglich ist. Kommt es unter diesen Bedingungen zu einem Verschwinden von C'_4 aus dem Überstand, so steht fest, daß unter den Bedingungen der 0,3 m NaCl-Lösung nicht nur eine Bindung von C'_1 an SA erfolgt, sondern auch, daß diese Bindung zu einer "Aktivierung" des gebundenen C'_1 gegenüber C'_4 führt.

Das Resultat des Versuchs ist in Tabelle 6 festgehalten. Tabelle 6 zeigt, daß das als C'_1 -Donator benutzte Euglobulin in frischem Zustand frei von C'_4 -inaktivierender Wirkung ist. Man sieht ferner, daß das Euglobulin-Präparat unter den Bedingungen, wie sie die 0,3 m NaCl-Lösung bietet, auch bei längerer Bebrütung (37°) unfähig ist, antikomplementäre Eigenschaften zu acquirieren. Das in einem 0,3 m Milieu dekomplementierte Euglobulin verliert seine C'_1 -Aktivität fast völlig. Eine C'_4 -inaktivierende Wirkung ist im Euglobulin auch nach Dekomplementierung nicht festzustellen. Das durch Dissoziation des entstandenen Komplexes SAC'_1 (0,3 m) erhaltene C'_1 -Präparat ist frei von jeder C'_4 -inaktivierenden Wirkung und hat einen hohen C'_1 -Titer. Das Präparat erlangt auch bei einem zweistündigen Verweilen im Milieu eines 0,15 m Phosphatpuffers von pH 7,6 keinerlei C'_4 -inaktivierende Eigenschaft. Wie man sieht, ist in dem 0,3 m NaCl-Milieu nicht nur die Bindung des C'_1 an den SA-Komplex möglich, sondern auch die nach der Bindung erfolgende "Aktivierung" gegenüber C'_4 : Ein im hyper-tonischen Milieu hergestelltes SAC'_1 ist in der Lage, auch

unter den Bedingungen des hypertonen Milieus mit angebotenem C'_4 zu reagieren. Dementsprechend verschwindet das im Versuch angebotene C'_4 in Gegenwart von SAC'_1 aus dem Überstand. Wird das in hypertonischem Milieu mit C'_4 behandelte SAC'_1 - in der Tabelle als $SAC'_{1,4}$ (0,3 m) bezeichnet - mit 8%-iger NaCl-Lösung behandelt, so gibt auch dieser Komplex ein Produkt ab, welches ebenso wie das zuerst genannte Dissoziationsprodukt einen hohen hämolytischen C'_1 -Titer aufweist und sich gegenüber C'_4 wiederum inert verhält.

Tabelle 6

Präparat	C'_1 -Titer	C'_4 -inaktivierungstiter	C'_4 -Titer des C'_4 Donators
Euglobulin (0,3 m)	256-512	∅	-
Euglobulin nach Alterung (0,3 m)	256-512	∅	-
Euglobulin dekomplementiert (0,3 m)	8	∅	-
Euglobulin des Dissoziationsprodukts aus SAC'_1 (0,3 m)	512-1024	∅	-
C'_4 -Präparat	∅	-	8 - 16
C'_4 -Präparat nach Behandlung mit SAC'_1 (0,3 m)	-	-	∅
Dissoziationsprodukt von $SAC'_{1,4}$ (0,3 m)	256-512	-	∅

Die in Tabelle 6 dargestellten Befunde sind am einfachsten zu erklären, wenn man annimmt, daß unter den geschilderten

Milieubedingungen der C'_1 -Donator an den SA-Komplex ausschließlich spezifisch bindbares C'_1 , aber kein antikomplementäres Material abgibt. Wird das so hergestellte SAC'_1 -Präparat nun der Dissoziationsbehandlung unterworfen, so liefert es ein hochaktives C'_1 -Präparat, welches gänzlich frei von jeder C'_4 -inaktivierenden Wirkung ist. Der Versuch sagt damit folgendes aus: Das C'_1 des Donators ist gegenüber C'_4 stets inert; das in freiem Zustand inerte C'_1 wird gegenüber C'_4 dann aktiv, wenn es an SA gebunden ist. Diese Fähigkeit geht aber nach Abtrennung des C'_1 vom SAC'_1 -Komplex wieder verloren. Sie erscheint wieder, sobald im hämolytischen Test das C'_1 in Gegenwart von R_1 an EA gebunden wird. Der geschilderte Versuch ergibt einen direkten Hinweis darauf, daß die Reaktionsbereitschaft gegen C'_4 an einen ganz bestimmten Zustand des C'_1 -Moleküls gebunden ist. Dieser Zustand ist nur dann gegeben, wenn das C'_1 als Bestandteil eines Antigen-Antikörper-Komplexes in gebundener Form vorliegt. Mithin ist die eingangs erwähnte, in den Thesen der amerikanischen Autoren implizite enthaltene Voraussetzung unzutreffend: Diese Voraussetzung besagt, daß die Aktivierung des C'_1 , einmal erfolgt, endgültig ist.

V. Die esterolytische Wirkung von C'₁-Präparaten

In den bisher beschriebenen Untersuchungen ist gezeigt worden, daß in zahlreichen C'₁-Präparaten neben der hämolytischen C'₁-Aktivität eine C'₄-inaktivierende Wirkung festzustellen ist. Es konnte gezeigt werden, daß diese beiden Wirkungen nichts miteinander zu tun haben: Die hämolytische C'₁-Aktivität ist offensichtlich mit gänzlich anderen Proteinen korreliert als die C'₄-inaktivierende Wirkung. Es bleibt jetzt noch festzustellen, ob die esterspaltende Wirkung, die in Meerschweinchen-C'₁-Präparaten von Becker und in Human-Präparaten von Lepow aufgefunden worden ist, etwas mit dem C'₁ zu tun hat oder nicht. Wie schon erwähnt, wird heute allgemein angenommen, daß "aktiviertes" C'₁ als Enzym auf C'₄ wirke; für enzymatisch aktives Meerschweinchen-C'₁ gilt TAME als das geeignete Nebensubstrat (Becker, 1959), während das "aktivierte" Human-C'₁ den Ester ATTEE besser spaltet (Lepow u. Mitarb., 1958).

1). Präparate aus Meerschweinchen-Serum

Es wurden die in der Tabelle 7 aufgeführten Präparate aus Meerschweinchen-Serum hergestellt und auf C'₁ sowie auf esterolytische Aktivität gegenüber TAME untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 7 wiedergegeben.

Die Tabelle 7 zeigt, daß keinerlei Korrelation zwischen dem C'₁-Titer und der esterolytischen Aktivität besteht. Dazu muß noch gesagt werden, daß Serumpräparationen ein und desselben Präparates bei verschiedenen Tieren schon deutliche Unterschiede im Verhältnis C'₁-Aktivität/esterolytische Aktivität aufweisen. Die höchsten Esteraseaktivitäten findet man bei C'_{Aether} und den Pseudoglobulinen, obwohl die Pseudoglobuline keinerlei C'₁-Aktivität enthalten. Bei Dekomplementierung

von Mittelstück, C' Aether und Dissoziationsprodukt wird offenbar eine bestimmte Menge Esterase an den Ag-Ak-Komplex gebunden, da im Überstand eine Reduktion der Esteraseaktivität festzustellen ist.

Tabelle 7

Die esterolytische Wirkung der C'₁-aktiven Präparate vom Meerschweinchen

Präparat	C' ₁ -Titer	Esterolyse gegen TAME
M	640	0,01
M ⁺	640	0,165
M _{dec}	∅	0,08
C' Aether	640	1,76
C' Aether dec	∅	0,48
Pseudoglobuline	∅	1,27
DP	640	0,05
M _{DP}	2500	0,44
M _{DP dec}	10	0,015

2). Präparate aus dem Serum anderer Säugetiere

Es wurde bei verschiedenen Tieren das Euglobulin, das konvertierte Euglobulin und das Euglobulin des Dissoziationsproduktes auf C'₁ und esterolytische Aktivität untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8

	Euglobulin		konvertiertes Euglobulin		spezifisch ge- reinigtes C' ₁	
	C' ₁	Esterase	C' ₁	Esterase	C' ₁	Esterase
Pferd	2500	0,35	1280	0,73	1280	0,9
Rind	1280	∅	1280	0,16	320	0,115
Hammel	1280	∅	1280	∅	320	∅
Ziege	1280	∅	640	∅	80	∅
Schwein	5000	∅	2500	∅	1280	∅
Kaninchen	640	0,14	320	0,265	320	0,43
Hamster	320	∅	320	0,08	2500	0,39
Ratte	1280	0,4	320	1,34	160	0,4
MS	640	0,01	640	0,165	2500	1,0

Die Tabelle 8 zeigt, daß bei den frischen Euglobulinen und auch bei den Euglobulinen des Dissoziationsproduktes für die Species Hammel, Schwein und Ziege keine Esteraseaktivität nachzuweisen ist, obwohl teilweise ein sehr hoher C'₁-Titer besteht.

Eine Korrelierung zwischen Esteraseaktivität und C'₁-Titer ist auch hier nicht möglich.

3). Herstellung eines spezifisch gereinigten, esterasefreien Meerschweinchen-C'₁-Präparates

Die Tatsache, daß bei verschiedenen Tieren das C'₁-Dissoziationspräparat hämolytisch hoch aktiv ist, dagegen keinerlei Esterase-Wirkung zeigt, deutet darauf hin, daß die esterolytische Wirkung mit der C'₁-Aktivität möglicherweise nichts zu tun hat. Für das Meerschweinchen, unser hauptsächlich benutztes Versuchstier, mußte diese Annahme erst in einem

besonderen Experiment bestätigt werden, denn gerade bei diesem Tier läßt sich durch die spezifische Reinigung mit anschließender Euglobulinpräzipitation kein Esterase-freies C'_1 -Präparat herstellen, wie Tabelle 7 zeigt. Es wurde deshalb versucht, ob die Herstellung eines SAC'_1 unter den Bedingungen der hohen Ionenstärke bei niederem pH hinsichtlich der Esteraseaktivität nicht ebenso brauchbare Resultate liefert, wie dies bei der Eliminierung der C'_4 -inaktivierenden Wirkung der Fall ist.

Es wurde der gleiche Versuch, wie er in Kapitel IV, 3 beschrieben ist, zur Herstellung eines SAC'_1 in 0,3 m Milieu angesetzt. Nach zweimaligem Waschen in 0,3 m NaCl-Lösung wird das Sediment in einer 8%-igen NaCl-Lösung aufgenommen und 15 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Es wird abzentrifugiert und der Überstand 1:8 verdünnt. Ein Teil dieses Präparates wird zur C'_1 -Titration verwendet, ein anderer Teil wird mit 0,01 m NaOH auf pH 8,2 gebracht und mit TAME auf esterolytische Wirkung getestet.

Es zeigte sich bei diesem Versuch, daß das anfallende Dissoziationsprodukt einen C'_1 -Titer von 2500 Einheiten/ml hatte. Eine esterolytische Wirkung war nicht nachzuweisen. Dies bedeutet, daß die Esteraseaktivität, wie sie in verschiedenen Präparaten neben C'_1 nachgewiesen wird, mit C'_1 nichts zu tun hat; sie muß als Aktivität eines Begleitstoffes angesehen werden, der bei dem beschriebenen Versuch von dem C'_1 -Präparat abgetrennt wird. Es erhebt sich die Frage, ob die Esterasewirkung nicht in enger Beziehung zu dem Träger der C'_4 -inaktivierenden Wirkung steht. Die Untersuchung dieser Frage überschreitet den Rahmen dieser Arbeit.

DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit ist die Frage untersucht worden, welches die Beziehung zwischen der hämolytischen C'_1 -Aktivität einerseits und der esterolytischen sowie der C'_4 -inaktivierenden Wirkung andererseits ist. Die Tatsache, daß diese drei Aktivitäten in zahlreichen Präparaten aus Menschen- und Meerschweinchenserum nachgewiesen werden und durch zahlreiche Reinigungsgänge hindurch stets nebeneinander erscheinen, hat zur Annahme geführt, sie seien alle drei auf die Wirkung des gleichen Moleküls zurückzuführen. Die Prämissen für diesen Schluß sind schon vor einigen Jahren kritisiert worden. So kann man z.B. die Frage stellen, ob die Hemmung der C'_4 -inaktivierenden Wirkung von gebundenem C'_1 durch DFP als echte Esterasehemmung verstanden werden kann. Pondman und Peetom (1964) haben darauf aufmerksam gemacht, daß der zur Hemmung notwendige Betrag von 10^{-3} exorbitant hoch erscheint; er liegt um Zehnerpotenzen über den Esterase-hemmenden Konzentrationen von DFP, wie man sie für andere Esterasen ermittelt hat und reicht in den Konzentrationsbereich hinein, in welchem die Denaturierung von Eiweiß beginnt. Dieser Einwand ist niemals befriedigend entkräftet worden.

In dieser Arbeit ist zunächst gezeigt worden, daß gewisse Fraktionen des Euglobulins frei von hämolytisch aktivem C'_1 sind, aber trotzdem antikomplementär wirken und auch eine erhebliche Esterase-Aktivität zeigen. Solche Präparate sind schon seit längerer Zeit bekannt. U.a. berichteten Lepow u. Mitarb. (1963) über eine solche Fraktion: Bei chromatographischer Auftrennung von antikomplementärem Euglobulin auf DEAE-Cellulose in Gegenwart von EDTA wird bei 0,37 m NaCl eine Fraktion eluiert, die sich als frei von hämolytischer C'_1 -Wirkung erweist. Diese Fraktion ("0,37-Fraktion") wirkt

aber esterolytisch und inaktiviert auch zugesetztes C'_4 . Die nahe liegende Schlußfolgerung, daß durch die besondere Art der Fraktionierung die Esterase-Aktivität und die C'_4 -inaktivierende Wirkung vom C'_1 getrennt werden, ist nicht gezogen worden. Die Autoren haben vielmehr die Ansicht vertreten, die "0,37-Fraktion" sei hämolytisch deshalb nicht mehr aktiv, weil sie nur eine einzige der drei Untereinheiten des "aktivierten" C'_1 -Moleküls repräsentiere; diese Untereinheit sei identisch mit der Esterase und damit auch mit dem antikomplementären Prinzip (Haines u. Lepow, 1964b). Hier taucht die Frage auf, ob ein inkomplettes und damit hämolytisch inaktives C'_1 mit C'_4 überhaupt reagieren kann. In dem Hämolyseprozess kann C'_4 bekanntlich nur dann gebunden werden, wenn vorher $k o m p l e t t e s C'_1$ gebunden worden ist. Aus den Angaben der Autoren kann man diesem Einwand nur eine Hilfhypothese entgegenstellen: Die Autoren nehmen an, das antikomplementäre und esterolytisch wirksame Molekül der "0,37-Fraktion" besitze noch die reaktive Gruppe gegenüber dem Ester bzw. gegenüber dem C'_4 , es fehle ihm aber die reaktive Gruppe für die Bindung an den Antigen-Antikörper-Komplex. Die durch die 0,37-Fraktion ausgelöste Veränderung von C'_4 wäre damit wesensgleich mit derjenigen Veränderung von C'_4 , die durch den Antigen-Antikörper- C'_1 -Komplex verursacht wird.

Die Auffassung, das esterolytische und C'_4 -inaktivierende Prinzip der "0,37-Fraktion" sei ein inkomplettes C'_1 , ist aufgrund eines Analogieschlusses entwickelt worden. Lepow u. Mitarb. (1963) hatten beobachtet, daß eine aus frischem, nicht antikomplementärem Euglobulin gewonnene und von ihnen C'_{1s} genannte Fraktion zur vollen C'_1 -Wirkung ergänzt wurde, wenn zwei andere, ebenfalls aus frischem Euglobulin gewonnene Fraktionen (er nannte sie C'_{1q} und C'_{1r}) mit ihr gemischt wurden. Die aus konvertiertem Euglobulin gewonnene esterolytische und antikomplementäre 0,37-Fraktion wird durch die gleiche NaCl-Konzentration von der DEAE-Säule eluiert, wie

die aus frischem Euglobulin stammende Fraktion C'_{1s} . Die Autoren folgerten deshalb, beide Fraktionen seien einander äquivalent: Die Fraktion C'_{1s} enthalte das Proenzym und die aus Euglobulin gewonnene 0,37-Fraktion enthalte das Enzym (Haines u. Lepow, 1964c). Ein klarer Beweis, daß das aktive Prinzip der aus antikomplementärem Euglobulin gewonnenen 0,37-Fraktion eine Untereinheit des C'_1 -Moleküls ist, steht aber bisher aus. Insbesondere ist es nicht gelungen zu zeigen, daß die 0,37-Fraktion zur vollen C'_1 -Wirkung komplettiert werden kann. Nach den skizzierten Befunden kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß die C'_1 -Wirkung, die esterolytische Wirkung und die C'_4 -inaktivierende Wirkung auf gänzlich verschiedenartige Trägersubstanzen zu beziehen sind.

Der Gedanke, daß das hämolytisch aktive C'_1 zwei unabhängige Reaktivgruppen besitze, von denen eine für die Verankerung am Antigen-Antikörper-Komplex zuständig ist, während die andere die Reaktion mit C'_4 vermittelt, ist unabhängig von den eben geschilderten Beobachtungen auch von Becker (1960) entwickelt worden. Becker (1959) hatte mit EDTA Dissoziationspräparate aus EAC' $_{1,4,2}$ -Zellen präpariert. Diese Dissoziationspräparate wiesen alle drei der genannten Wirkungen auf (hämolytische C'_1 -Aktivität, Esterolyse, C'_4 -inaktivierende Wirkung). Bei einer Schädigung des Dissoziationspräparates durch Säure verschwand die hämolytische C'_1 -Aktivität, während die C'_4 -inaktivierende Wirkung und die esterolytische Wirkung erhalten blieben. Becker (1959, 1960) zog aus diesem Befund nicht den Schluß, daß es sich möglicherweise um verschiedene Stoffe handle; er folgerte vielmehr, die Säureschädigung würde an ein und demselben Molekül eine Wirkgruppe inaktivieren und die andere Wirkgruppe intakt lassen.

Unsere Versuche erweisen des weiteren, daß bei verschiedenen Tieren die C'_1 -Präparate ein durchaus verschiedenartiges

Verhalten zeigen. Die für Human- und für Meerschweinchenpräparate charakteristische Fähigkeit spontan zu konvertieren, d.h. antikomplementäre und esterolytische Eigenschaften zu acquirieren, fehlt gänzlich bei Euglobulinpräparaten der Species Rind, Hammel, Ziege. Dies könnte zunächst bedeuten, daß bei diesen Tieren Stoffe in der Euglobulinfraktion enthalten sind, welche die Konversion blockieren. Wie man weiß, verbleiben Stoffe dieser Art beim Meerschweinchen und beim Menschen in der Pseudoglobulinfraktion. Es zeigte sich aber nun in weiteren Versuchen, daß bei den genannten Species die Konversion zur esterolytischen und C'_4 -inaktivierenden Wirkung auch dann ausbleibt, wenn das entsprechende C'_1 spezifisch an SA gebunden und dann abgesprengt wird. Im Sinne der Esterasetheorie müßten diese Präparate als "aktiviertes C'_1 " betrachtet werden; dementsprechend müßten sie C'_4 inaktivieren und Ester spalten. Da dies bei Dissoziationspräparaten der Species Rind, Hammel und Ziege nicht der Fall ist, liegt es nahe anzunehmen, daß die hämolytische C'_1 -Wirkung mit der esterspaltenden und der C'_4 -inaktivierenden Wirkung der konvertierten Euglobulinfraktion nichts zu tun hat. Diese Schlußfolgerung ist aber nur dann erlaubt, wenn es gelingt, am Meerschweinchenpräparat die funktionelle Trennung der drei Wirkungen zu demonstrieren.

Die Elektrophorese von konvertiertem Meerschweinchen-Euglobulin ergibt eine Trennung der hämolytischen C'_1 -Wirkung einerseits und der C'_4 -inaktivierenden Wirkung andererseits. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die C'_4 -inaktivierende Wirkung, die bei der Konversion des Meerschweinchen-Euglobulins auftritt, möglicherweise nicht auf einer Veränderung des C'_1 beruht, sondern einen ganz anderen Eiweißkörper betrifft. Diese Annahme erfährt eine Stütze in der Beobachtung, daß bei der Konversion von Meerschweinchen-Euglobulin das C'_1 keinen Titerverlust erleidet. Dies spricht dafür, daß das C'_1 bei der Konversion nicht beteiligt ist. Es bleibt

dann aber noch immer die Möglichkeit, daß ein Meerschweinchen- C'_1 durch seine Bindung an den Antigen-Antikörperkomplex esterolytisch und antikomplementär wird und diese Eigenschaften nach der Dissoziation behält. Diese Schlußfolgerung ist aber nicht haltbar, wie sich aus den weiteren Versuchen ergibt. Die Dissoziation eines im hypertonen Milieu hergestellten Meerschweinchenpräparates vom Typ SAC'_1 liefert ein Produkt, welches bei hoher hämolytischer C'_1 -Aktivität frei von esterolytischer und C'_4 -inaktivierender Wirkung ist. Das so erhaltene C'_1 -Präparat ist unfähig zur Konversion.

Der Einwand kann vorgebracht werden, in einem Milieu von 0,3 m NaCl und pH 5,8 könne sich C'_1 wohl an SA binden, das unter diesen Umständen gebundene C'_1 bleibe aber unwirksam gegenüber C'_4 . Wenn dieser Einwand berechtigt ist, dann würde der erwähnte Absprengversuch nur bedeuten, daß es möglich ist, C'_1 an SA zu binden und abzusprengen, ohne es im Hinblick auf C'_4 zu "aktivieren". Der Kontrollversuch zeigt aber nun, daß unter den Bedingungen, wie sie die 0,3 m NaCl-Lösung bietet, der SAC'_1 -Komplex ein angebotenes C'_4 völlig inaktiviert. Des weiteren erweist dieser Versuch, daß die Esteraseaktivität, die bei der Konversion von Euglobulin auftritt und in einigen Dissoziationsprodukten erscheint, mit dem C'_1 nichts zu tun haben kann. - Die Versuche beweisen weiterhin, daß es mindestens zwei verschiedene Wege gibt, auf denen C'_4 inaktiviert werden kann. Diese beiden Wege lassen sich nach den Versuchen zusammenfassend folgendermaßen charakterisieren:

a). Es kann das an den Antigen-Antikörper-Komplex gebundene C'_1 mit dem angebotenen C'_4 reagieren und es dadurch aus der flüssigen Phase zum Verschwinden bringen. Freies, noch nicht gebundenes C'_1 ist hierzu unfähig und kann diese Eigenschaft spontan, d.h. ohne Bindung an Antigen-Antikörper-Komplexe auch niemals gewinnen. Ein einmal gebundenes C'_1 behält seine

Aktivität nur solange, als die Bindung mit dem Antigen-Antikörper-Komplex besteht. Wird das C'_1 vom Antigen-Antikörper-Komplex abgesprengt, so ist es von einem freien C'_1 , welches niemals gebunden war, nicht zu unterscheiden. Es hat seine während der Bindung an Antigen-Antikörper-Komplex bestehende Fähigkeit zur C'_4 -Inaktivierung verloren. Das abgesprengte Präparat kann aber wieder an einen Antigen-Antikörper-Komplex gebunden werden und entfaltet dann erneut die Fähigkeit, C'_4 zu inaktivieren.

b). Ein von C'_1 distinktes System kann C'_4 "unspezifisch" inaktivieren. Diese Inaktivierungsreaktion ist unabhängig von der Anwesenheit von Antigen-Antikörper-Komplexen. Die Fähigkeit zur C'_4 -Inaktivierung auf diesem Weg wird von gewissen Serum-Eiweiß-Fractionen unter bestimmten Umständen spontan erworben (Konversion). Die Konversionsreaktion betrifft nicht das gegebenenfalls anwesende C'_1 .

Es bliebe noch zu überlegen, ob das gebundene C'_1 auf C'_4 nicht doch im Sinne eines Enzyms wirkt. Hierzu müßte vor allem untersucht werden, ob der unter den Bedingungen der hohen Ionenstärke hergestellte Komplex SAC'_1 als solcher wirklich frei von jeder esterolytischen Wirkung ist. Diese Untersuchung ist allerdings wegen des hohen pH-Optimums der Esterolysereaktion schwierig. Theoretisch besteht die Möglichkeit, daß die auf C'_4 wirkende Reaktivgruppe des gebundenen C'_1 auch eine Esterspaltung bewirken kann. Ein Anhaltspunkt für diese Annahme besteht aber aufgrund der vorliegenden Arbeit nicht mehr. Die von der Esterase-Kontroverse unabhängige Frage, ob die Natur der Reaktion zwischen SAC'_1 und C'_4 nicht doch als Enzymreaktion verstanden werden kann, bleibt weiterhin offen. Sie ist experimentell sicherlich nicht leicht zu bearbeiten. Zum klassischen Enzymbegriff gehört die chemische Charakterisierbarkeit des Substrates und des Reaktionsproduktes. Diese Möglichkeit ist für die hier

behandelte Reaktion z.Zt. nicht gegeben. Des weiteren gehört zum Enzymbegriff eine charakteristische Reaktionskinetik. Die Kinetik der Reaktion $\text{Ag-Ak-C}'_1 + \text{C}'_4$ kann aufgrund der bisher vorliegenden Daten nur ganz summarisch beurteilt werden. Nach den bisher vorliegenden Untersuchungen scheint sie mehr einer Adsorptionsreaktion als einer enzymatischen Reaktion zu ähneln.

ZUSAMMENFASSUNG

1). Es wird eine Methode zur spezifischen Reinigung der ersten Komplement-Komponente (C'_1) beschrieben. Die Methode beruht auf der funktionell isolierten Bindung von C'_1 an Immunaggregate (SA) mit nachfolgender Absprengung.

2). Es wird die esterolytische, die antikomplementäre und die hämolytische Aktivität verschiedenartig hergestellter C'_1 -Präparate geprüft. Die Untersuchungen erstrecken sich auf mehrere Säugetiere; hierbei wird dem Meerschweinchen besondere Aufmerksamkeit zugewendet. Bei den verglichenen Untersuchungen der Präparate verschiedener Tiere ergibt sich keine faßbare Korrelation zwischen den drei Aktivitäten.

3). Beim antikomplementär gewordenen (konvertiertem) Meerschweinchen-Euglobulin ist es möglich, die antikomplementäre Aktivität von der hämolytischen Aktivität elektrophoretisch zu trennen. Darüber hinaus wird demonstriert, daß bei der Konversion des Euglobulins das Erscheinen der antikomplementären und esterolytischen Aktivität ohne eine Einbuße an hämolytisch aktivem C'_1 erfolgt.

4). Bindet man aus einem geeigneten Komplementfragment in hypertonischem, leicht saurem Milieu C'_1 an einen Immunkomplex, so ergibt die nachfolgende Absprengung ein hämolytisch hochaktives C'_1 -Präparat, welches frei von esterolytischer und antikomplementärer Aktivität ist.

5). Aus den Beobachtungen werden folgende Schlüsse gezogen: Die Fähigkeit des C'_1 mit C'_4 zu reagieren, beruht auf einer reversiblen Aktivierung des C'_1 . Diese Aktivierung

erfolgt nicht spontan, sondern nur durch Bindung des C'_1 an den Antigen-Antikörper-Komplex. Durch Abspaltung geht die Fähigkeit des gebundenen C'_1 , mit C'_4 zu reagieren, wieder verloren; es kann aber durch Bindung an einen Antigen-Antikörper-Komplex erneut aktiviert werden. Die Konversion von Euglobulin läßt das C'_1 unberührt; sie liefert ein von C'_1 unabhängiges Produkt, welches C'_4 "unspezifisch" inaktivieren kann. Die esterolytische Aktivität der C'_1 -Präparate hat mit der Fähigkeit von C'_1 , C'_4 spezifisch zu inaktivieren, nichts zu tun.

LITERATURVERZEICHNIS

BECKER, E.L.:

Inhibition of complement activity by Diisopropyl-
fluorophosphate
Nature 176, 1073 (1955)

BECKER, E.L.:

Concerning the mechanism of complement action
I. Inhibition of Complement Activity by Diisopropyl
Fluorophosphate
J. Immunol. 77, 462 (1956a)

BECKER, E.L.:

Concerning the mechanism of Complement Action
II. The nature of the first component of Guinea pig
Complement
J. Immunol. 77, 469 (1956b)

BECKER, E.L.:

Concerning the mechanism of Complement Action
IV. The properties of activated first component
of Guinea pig Complement
J. Immunol. 82, 43 (1959)

BECKER, E.L.:

Concerning the mechanism of Complement Action
V. The early steps in Immune hemolysis
J. Immunol. 84, 299 (1960)

BECKER, E.L.:

Early steps in immune hemolysis, in:
Immunochemical Approaches to Problems in Microbiology
(M. Heidelberger and O.J. Plescia, eds.)
p. 245. Rutgers Univ. Press, New Brunswick,
New Jersey (1961)

BORSOS, T., H.J. RAPP and U.Z. WALZ:

Action of the First Component of Complement
J. Immunol. 92, 108 (1964)

BRAKKE, M.K.:

Zone electrophoresis of dyes, proteins and viruses
in density gradient columns of sucrose solutions
Arch. Biochem. and Biophys. 55, 175 (1955)

COLLI, A., W. OPFERKUCH und P. KLEIN

Studien über den Mechanismus der Immunnämolyse:
Der Bindungsmodus der vierten Komplementkomponente
Zeitschr. f. Hyg. 147, 213 (1961)

COMPLEMENT WORKSHOP, BETHESDA MLD., 1963:

siehe: Rapp, H.J. and T. Borsos
Complement and hemolysis
Science 141, 738 (1963)

COMPLEMENT WORKSHOP, LA JOLLA, CALIF., 1966:

siehe:
Immunochemistry 1966 (im Druck)

FOLIN, O., und V. CIOCALTEU:

On Tyrosine and Tryptophane
Determinations in Proteins
J. Biol. Chem. 73, 627 (1927)

HAINES, A.L., und J.H. LEPOW:

Studies on Human C'₁-Esterase
III. Effect of Rabbit Anti-C'₁-Esterase on
Enzymatic and Complement Activities
J. Immunol. 92, 479 (1964a)

HAINES A.L. and J.H. LEPOW:

Studies on Human C'₁-Esterase
I. Purification and Enzymatic Properties
J. Immunol. 92, 456 (1964b)

HAINES A.L. and J.H. LEPOW:

Studies on Human C'₁-Esterase

II. Function of Purified C'₁-Esterase in the
Human Complement System

J. Immunol. 92, 468 (1964)

KABAT E. and M.M. MAYER:

Experimental Immunchemistry, 2nd. ed., p. 133

Thomas, Springfield/Illinois (1961)

KLEIN, P.:

Studies on immune hemolysis: Preparation of a stable
and highly reactive complex of sensitized erythro-
cytes and the first component of complement (EAC'₁);
Inactivation of cell-fixed C'₁ by some complement
reagents

J. Exp. Med. 111, 77 (1960)

KLEIN, P., and P. BURKHOLDER:

Studies on the antigenic properties of complement

I. Demonstration of agglutinating antibodies against
guinea pig complement fixed on sensitized sheep
erythrocytes

J. Exp. Med. 111, 93 (1960)

KLEIN, P. und A. COLLI:

Herstellung und Auswertung von "Anti-Komplement"

Z. Hyg. 147, 201 - 212 (1961)

KLEIN, P.:

in: Ciba Foundation Symposium on Complement
(G.E. Wolstenholme and J. Knight, eds.),
Churchill, London, (1964)

KLEIN, P.G. and H.J. WELLENSEK:

Complement: Hemolytic Function and Chemical Properties
Intern. Rev. of exp. Pathology 4 245 (1965a)

KLEIN, P. and H.J. WELLENSEK:

Multiple nature of the third component of guinea pig complement. I. Separation and characterization of three factors a, b and c, essential for hemolytic Immunology 8, 590 (1965b)

KLEIN, P.G.:

In: 15. Colloquium Dtsch. Ges. f. physiol. Chemie, Mosbach/Baden
Springer, Heidelberg (1965)

LEPOW, J.H., L. PILLEMER and O.D. RATNOFF:

The influence of calcium ions on the inactivation of human complement and its components by plasmin J. Exp. Med. 98, 277 (1953)

LEPOW, J.H., L. WURZ, O.D. RATNOFF and L. PILLEMER:

Studies on the mechanism of inactivation of human complement by plasmin and by antigen-antibody-aggregates
J. Immunol. 73, 146 (1954)

LEPOW, J.H., O.D. RATNOFF and L. PILLEMER:

Elution of an Esterase from Antigen-Antibody-Aggregates treated with Human Complement
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 92, 111 (1956)

LEPOW, J.H., O.D. RATNOFF, F.S. ROSEN and L. PILLEMER:

Observations on a pro-esterase associated with partially purified first Component of Human Complement (C'₁)
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 92, 32 (1956b)

LEPOW, J.H., O.D. RATNOFF and L.R. LEVY:

Studies on the activation of a proesterase
associated with partially purified first component
of human complement

J. Exp. Med. 107, 451 (1958)

LEPOW, J.H.:

Complement: A Review (including Esterase-activity)
in: "Mechanisms of Hypersensitivity (J.H. Shaffer
et al., eds.) p. 267; Little, Brown, Boston/
Massachusetts (1959)

LEPOW, J.H. and M.A. LEON:

Interaction of a serum Inhibitor of C'₁-Esterase
with intermediate complexes of the immune hemolytic
system.

I. Specificity of inhibition of C'₁ activity
associated with intermediate complexes.

Immunology 5, 222 (1962)

LEPOW, J.H., G.B. NAFF, B.W. TODD, J. PENSKY and C.F. HINZ jr.:

Chromatographic resolution of the first component
of human complement into three activities

J. Exp. Med. 117, 983 (1963)

LEPOW, J.H., G.B. NAFF and J. Pensky:

Mechanisms of activation and inhibition of C'₁-
esterase in:

"Ciba Found. Symp. Complement"

(G.E.W. Wolstenholme and J. Knight, eds.) p. 74
Churchill, London (1965)

LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FAHR and R.J. RANDALL:

Protein Measurement with the Folin Phenol reagent

J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

MAYER, M.M., C.C. CROFT and M.M. GRAY:

Kinetic studies on immune hemolysis I. A method

J. Exp. Med. 88, 427 (1948)

MAYER, M.M.:

Mechanism of hemolysis by complement in:

"Ciba Found. Symp. Complement" (G.E.W. Wolstenholme and J. Knight, eds.), Churchill, London (1965)

MÜLLER-EBERHARD, H.J. und H.G. KUNKEL:

The carbohydrate of γ -Globuline and myeloma proteins
J. Exp. Med. 104, 253 (1956)

MÜLLER-EBERHARD, H.J. and J.G. KUNKEL:

Isolation of a thermolabile Serum protein which precipitates γ -globuline aggregates and participates in immune hemolysis
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 106, 295 (1961a)

MÜLLER-EBERHARD, H.J.:

Isolation and description of proteins related to the human complement system
Acta Soc. Med. Upsalien 66, 152 (1961b)

MÜLLER-EBERHARD, H.J.:

Chemical Aspects of Human Complement components in: "Mechanism of cell and tissue damage produced by immune reactions".
Basel, Benno Schwabe & Co. (1962)

MÜLLER-EBERHARD, H.J.:

Chemie der Komplementfaktoren, in:
15. Colloquium, Dtsch. Ges. f. physiol. Chemie, Mosbach/Baden. Springer, Heidelberg (1965a)

MÜLLER-EBERHARD, H.J. and J.H. LEPOW:

C'₁-esterase effect on activity and physico-chemical properties of the 4th component of complement
J. Exp. Med. 121, 819 - 833 (1965)

MÜLLER-EBERHARD, H.J., A.P. DALMASSO and M.A. CALCOTT:

The reaction mechanism of B_{1c} -Globulin (C'₃) in
immune hemolysis

J. Exp. Med. 123, 33-54 (1966)

NAFF, G.B., J. PENSKY and J.A. LEPOW:

The makromolecular nature of the first component of
complement

J. Exp. Med. 119, 593 (1964)

NELSON, R.A. jr., J. JENSEN, J. GIGLI and N. TAMURA:

Methods for the separation, purification and
measurement of nine components of hemolytic comple-
ment in guinea pig serum

Immunochemistry, (1966), im Druck

OPFERKUCH, W., A. COLLI and P. KLEIN:

Studien über den Mechanismus der Immunhämolysse:

Die Bindung der zweiten Komplement-Komponente

Z. Hyg. 147, 230 (1961)

OPFERKUCH, W. und H.G. MÜLLER:

Hämolyssestudien mit S^{35} -markiertem Meerschweinchen-
komplement: Über den Substanzzuwachs bei der Bindung
der ersten und vierten Komplementkomponente

Z. Hyg. 149, 271 (1963)

OPFERKUCH, W. und P. KLEIN:

Studies on the antigenic properties of complement III,
Specific inactivation of cell-fixed components of

guinea-pig complement by anti-complement

Immunology 7, 261 (1964)

PILLEMER, L. and E.E. ECKER:

Terminology of components of complement

Science 94, 437 (1941)

PORATH, J. and P. FLODIN:

Gel-Filtration: A method for desalting and group separation

Nature 183, 1657 (1959)

PONDMAN, K.W. and F. PEETOM:

Immunochemistry 1, 65 (1964)

RATNOFF, O.D. and J.H. LEPOW:

Some properties of an esterase derived from preparations of the first component of complement

J. Exp. Med. 106, 327 (1957)

WELLENSIEK, H.J., R. SAUTHOFF and P. KLEIN:

Über die komplexe Natur der dritten Komplement-Komponente: Nachweis von gebundenem C'_{3a} durch Agglutination und durch Funktionsblockade mit Anti-Komplement

Path. et Mikrobiol. 26, 665 (1963)

WELLENSIEK, H.J. and P. KLEIN:

Multiple nature of the third component of guinea pig serum

II. Separation and description of two additional factors B and d; preparation and characterization of four intermediate products.

Immunology, 8, 604 (1965)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr.
P. Klein für die freundliche Überlassung
des Themas sowie für seine ständige Unter-
stützung und Beratung aufrichtig danken.

LEBENS LAUF

Am 20. 4. 1930 wurde ich als Tochter des Schlossermeisters Richard Große und seiner Ehefrau Anna, geb. Löbe, in Pouch, Kreis Bitterfeld geboren. Von Ostern 1936 bis 1940 besuchte ich die Volksschule in Pouch; später die Oberschule für Mädchen in Bitterfeld, wo ich 1948 die Reifeprüfung bestand. Ab Wintersemester 1948/49 studierte ich Chemie an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle/Saale. Nach drei Semestern wechselte ich das Hauptfach und belegte an Stelle von Chemie Biologie.

Von 1951 bis 1952 studierte ich an der Universität Greifswald. Im Herbst 1954 bestand ich in Halle/Saale die Diplomprüfung in Biologie.

Ab 1. September 1961 wurde ich mit der Verwaltung einer wissenschaftlichen Assistentenstelle am Institut für medizinische Mikrobiologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz betraut.

